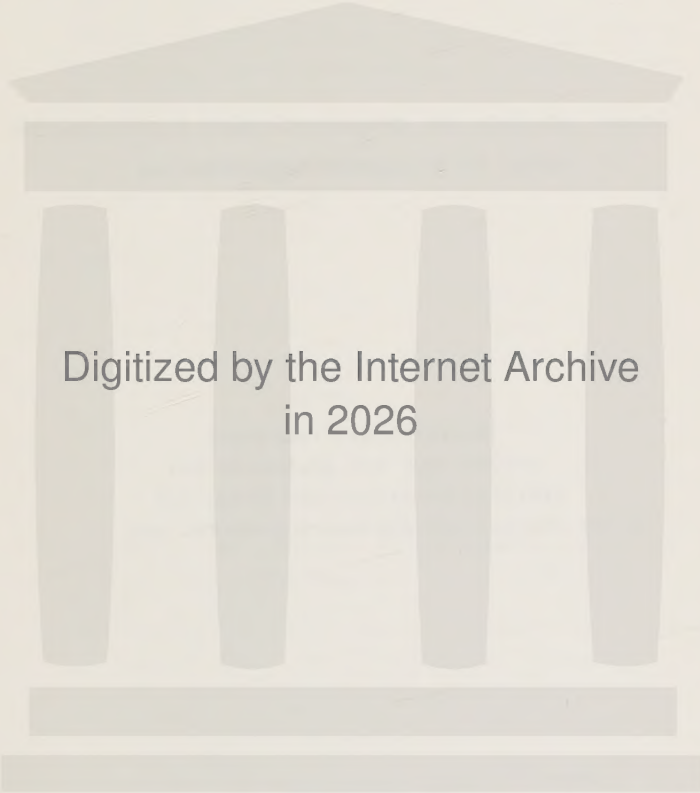


UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BINDUNG VON COMPOUND 48/80
AN KANINCHENNIERENZELLEN IN VITRO

vorgelegt von

wolfgang Strecker

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BINDUNG VON COMPOUND 48/80
AN KANINCHENNIERENZELLEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Wolfgang Strecker

aus Heiligenstadt (Mischfeld)

M a i n z 1972

Dekan: Professor Dr. K.H.Bäßler

Referent: Professor Dr. D.Falke

Korreferent: Professor Dr. P.Klein

Tag der mündlichen

Prüfung: 11. Januar 1973



Gesamtherstellung: DITTERS BÜRODIENST
Mainz/Heidesheim/Rh.
Telefon 06132 / 5711

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	<u>Einleitung</u>	1
II.	<u>Material und Methoden</u>	5
	1) Extrakterstellung	5
	2) Cpd 48/80	5
	3) Dünnschichtchromatographie	6
	4) Messung der Radioaktivität	7
	5) Cholin-Einbau	7
	6) Spaltung der Lipide durch Enzyme	8
	7) Bindung von Cpd 48/80 an DNS	8
	8) Kontrollversuche	9
III.	<u>Ergebnisse</u>	11
	1) Bindung und Aufnahme von Cpd 48/80 durch die Zelle	11
	2) "Bilanzversuche" mit Cpd 48/80 bei der Lipoidextraktion	14
	3) Dünnschichtchromatographische Eigen- schaften des Cpd 48/80	16
	4) Chromatographische Untersuchung eines Lipoidextraktes mit Cpd ^3H -48/80	17
	5) Chromatographie von Mischungen des Cpd ^3H -48/80 mit Substanzen des Lipoidextrak- tes	19
	6) Enzymatische Spaltung der Lipide eines Extraktes mit Cpd ^3H -48/80 und Chromato- graphische Untersuchung der Spaltprodukte	21
	7) Einfluß von Cl^- und PO_4^{---} -Ionen auf die Verteilung von Cpd ^3H -48/80 auf der Dünnschichtplatte und die Reaktion von Cpd 48/80 mit DNS	25
IV.	<u>Diskussion</u>	30
V.	<u>Zusammenfassung</u>	34
VI.	<u>Literaturverzeichnis</u>	35

I. Einleitung

Kaninchennierenzellen bilden in vitro nach der Infektion mit riesenzellbildenden Varianten des Herpesvirus hominis zunächst Plasmabrücken zu den umliegenden Zellen aus. Diese Plasmabrücken verbreitern sich und bewirken schließlich die Fusion zahlreicher Einzelzellen, so daß Riesenzellen oder Polykaryozyten entstehen (2).

Durch Untersuchungen aus dem hiesigen Arbeitskreis wurde zunächst versucht, das Phänomen der Riesenzellbildung kausal mit der Virussyntese zu verknüpfen. Die Untersuchungen mit Stoffwechsellinhibitoren haben zur Aufklärung dieser Vorgänge wesentlich beigetragen.

Dabei ergab sich, daß die 2 Stunden post infectionem (p.i.) erfolgende Transsscription und die bis zu 3 Stunden p.i. erfolgende Translation für die Riesenzellbildung (RZB) und für die Virus-DNS-Synthese gleichermaßen unerläßlich sind. Die Information für die RZB geht also vom Elterngenom aus. Dies wurde auch durch andere Versuchsanordnungen bewiesen (8). 3 1/2 Stunden p.i. ist noch eine vollständige Hemmung der RZB möglich, wenn durch 2, 4-Dinitrophenol die Atmung entkuppelt wird; die Virus-DNS-Synthese ist durch denselben Hemmstoff nicht mehr völlig zu unterbinden. Ähnliche Wirkungen ließen sich auch mit Zn^{++} -Ionen erzielen, die eine Hemmung der Energielieferung durch Mitochondrien bewirken sollen. Offenbar folgt auf die Translation ein für die RZB erforderlicher, energieabhängiger Schritt (1).

Cycloheximid hemmt, wenn es nach dem Abschluß der Translationsphase gegeben wird, die Riesenzellbildung nicht mehr. Hat die Riesenzellbildung also einmal begonnen, so läuft sie unabhängig von der de novo-Synthese von Proteinen ab.

Durch die Anwendung des Compound (Cpd) 48/80 konnten weitere wichtige Ergebnisse gewonnen werden.

Das Cpd 48/80 ist seit langem als Histaminliberator bekannt und in dieser Eigenschaft in der experimentellen Forschung vielfach angewendet worden (13). Es entsteht durch Kondensation von p-Methoxyphenyl-äthyl-methylamin mit Formaldehyd (11). Die Moleküle sind über Methylenbrücken zu einem Gemisch von Mono-, Di-, Tri- und wahrscheinlich Tetrameren verbunden. Die Iminogruppe kann in geladener Form vorliegen. Es muß allerdings festgestellt werden, daß über den Wirkungsmechanismus des Cpd 48/80 hinsichtlich der Histamin-Freisetzung nichts bekannt ist.

Im Infektionszyklus des in vitro-Versuches wirkt das Cpd 48/80 bereits frühzeitig auf die Adsorption und die Penetration des Virus: Beide Vorgänge werden durch Cpd 48/80 gehemmt. Die für Cpd 48/80 sensible Phase endet 30 Minuten p.i. (25µg/ml Cpd 48/80). wenn Cpd 48/80 später verabreicht wird, ist die Menge des virusspezifischen Antigens und die Virusausschüttung nicht verringert, da die Virussynthese dann ungestört abläuft (7). Im Gegensatz zu allen anderen Hemmstoffen verhindert aber Cpd 48/80 die RZB auch noch bis 4 Stunden p.i., also bis unmittelbar zu ihrem Beginn. Anstelle der RZB beobachtet man dann nur noch Zellabkuglung. Sogar die Vergrößerung von schon bestehenden Riesenzellen kann durch Cpd 48/80 sofort und vollständig blockiert werden. Dieser Effekt auf die RZB läßt sich durch Zugabe von 5-10µg/ml Cpd 48/80 erzielen (7).

Im Zusammenhang mit den eingangs dargestellten Ergebnissen lassen diese Feststellungen den Schluß zu, daß in die zur Riesenzellbildung führende Kausalkette nach der Translation und der Transskription bestimmte Prozesse eingeschaltet sind, die unabhängig von der Virus-DNS- und der Virus-Protein-Synthese ablaufen. Gerade der letzte Abschnitt dieser Kausalkette (etwa 4 Stunden p.i.) wird durch Cpd 48/80 blockiert. Das Cpd 48/80 bietet somit neue Möglichkeiten, das Phänomen der RZB zu untersuchen.

Die durch manche Herpesstämme hervorgerufene Zellabkuglung wird bei lichtoptischer Betrachtung durch das Cpd 48/80 nicht beeinflusst. Auch hier ist die Virusaussbeute normal (?).

Funktionen und Synthesevorgänge der nichtinfizierten Zellen wie Mitosefähigkeit, ^3H -Index sowie der Einbau von ^3H -Thymidin, ^3H -Uridin oder von tritium-markierten Aminosäuren sind nach Anwendung von Cpd 48/80 ($25\mu\text{g}/\text{ml}$) kaum gestört (?). Allerdings wurde eine geringgradige Aktivierung der Lysosomen beobachtet. Die Aktivierung der Lysosomen wird mit einiger Wahrscheinlichkeit durch Permeabilitätsstörungen der Membran bewirkt. Als Folge einer Selbstverdauung nach der Aktivierung der Enzyme entstehen autophagische Vacuolen (6). Geringe Konzentrationen von Resochin, Butylamin und Strukturverwandten des Monomers von Cpd 48/80 bewirken zwar eine Aktivierung der Lysosomen, sie erzeugen aber keine Hemmung der RZB. Erst bei sehr hohen Konzentrationen wird auch die RZB geringgradig gehemmt. Die Aktivierung der Lysosomen und die Hemmung der RZB lassen sich also auf unterschiedliche Wirkungen der genannten Substanzen zurückführen (6).

Nach den bisherigen Ergebnissen liegt es nahe, eine direkte Wirkung des Cpd 48/80 auf die Membran der Lysosomen und vielleicht auf die Zellmembran anzunehmen, da die Aktivierung der Lysosomen wahrscheinlich durch Permeabilitätsstörungen an ihrer Membran hervorgerufen wird; auch die durch Cpd 48/80 in ihrer letzten Phase gehemmte, zur RZB führende Kausalkette, wird wahrscheinlich direkt an der Zellmembran beeinflusst. Hier sollte erwähnt werden, daß die bisherigen Analysen der Lipoid-Biosynthese im Verlauf der RZB keine Veränderungen erkennen ließen. Insbesondere wurden Lysolecithin oder Lysokephalin im Verlauf der RZB nicht in vermehrter Menge nachgewiesen (9). Es zeigte sich jedoch, daß Cpd 48/80 den Einbau von ^3H -Cholin oder von ^3H -Äthanolamin in die Zellen er-

heblich reduziert. Diese Substanz hemmt also die Biosynthese von Lecithin oder von Kephalin insgesamt. Dabei bleibt offen, ob lediglich die Einschleusung von Cholin in die Zelle oder seine Phosphorylierung oder weitere Schritte der Biosynthese gehemmt werden. Andererseits war der Einbau von ^3H -Ölsäure in Lecithin durch Cpd 48/80 (25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nicht gehemmt. Die Wirkung des Cpd 48/80 erstreckt sich insofern nur auf die zum Einbau des Cholins führenden Biosynthesevorgänge. Besonders wichtig für die Begründung der folgenden Versuche ist die Tatsache, daß das Cpd 48/80 fest von der Zelle gebunden wird und dadurch offenbar sowohl die Penetration als auch die RZB hemmen kann (7).

Zu Beginn der Darstellung sollen zunächst diejenigen Versuche beschrieben werden, welche die Bindung und die Aufnahme des Cpd 48/80 durch die Zelle beweisen und damit die Annahme rechtfertigen, daß es dem Cpd 48/80 möglich ist, besondere Wirkungen an der Zellmembran und/oder in der Zelle zu entfalten. Die Wirkungen des Cpd 48/80 hinsichtlich seiner Wirkung bei der Hemmung der RZB, der Lysosomenaktivierung, der Penetration des Virus und der Hemmung des Cholin- oder Äthanolamin-Einbaus in die Zellen ließen es anschließend aussichtsvoll erscheinen, Lipoidextrakte aus mit Cpd 48/80 behandelten Kaninchennierenzellen herzustellen und zum Ausgangspunkt von Untersuchungen über den Bindungsort in der Zelle zu machen. Dabei ergab sich, daß Cpd 48/80 in der Zelle in seinem chromatographischen Verhalten verändert wird. Es erwies sich deshalb als erforderlich, die Ursache dieser Veränderung - soweit möglich - zu ergründen. Zugleich sollten diese Untersuchungen zu zeigen versuchen, an welche chemischen Strukturen oder Struktureinheiten dieses Compound gebunden wird. Die Tatsache, daß sehr kleine Konzentrationen des Compound wirksam sind, macht es wahrscheinlich, daß sich diese Substanz an einen bestimmten "Rezeptor" bindet, der unmittelbar mit der Auslösung der RZB verknüpft ist. Ob dieser "Rezeptor" für alle genannten Wirkungen von Cpd 48/80 identisch einheitlich ist oder nicht, muß dabei offen bleiben.

II. Material und Methoden

Extraktherstellung

Die Züchtung der Kaninchennierenzellen und des Herpesvirus erfolgte wie früher beschrieben (1).

Zur Extraktherstellung wurde aus den zur Züchtung der Zellen verwendeten Roux-Flaschen oder Petrischalen die Nährlösung abgegossen und der Zellrasen mit Kochsalz-Phosphatpuffer gespült. Die Zellen wurden dann ebenfalls in NaCl-Phosphatpuffer (0,9% NaCl und m/50 Phosphatpuffer, pH 7,4) abgekratzt, 5 Minuten bei 4000 U/min abzentrifugiert und in Wasser aufgenommen. (Für die Zellen von einer Roux-Flasche oder von 4 Petrischalen wurden 3ml Wasser verwendet.) Anschließend wurden die Zellen mit einem Gerät der Firma Mullard durch Ultraschall zerstört. Die so entstandene Suspension von Zellbestandteilen wurde nun in einem Aceton-Trockeneisgemisch eingefroren und mit einem Gerät der Firma Leybold lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in einem Lipidlösungsmittel aufgenommen (für das Lyophilisat von 1 Roux-Flasche wurden 30ml Chloroform-Methanol (2:1) verwendet) und filtriert. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer eingengt und in Methanol gelöst, und zwar für die Zellen einer Roux-Flasche in 1ml Methanol.

Compound 48/80

Das Cpd 48/80 verdanken wir der Firma Burroughs Wellcome, Inc. Tuckahoe/USA. Mit Tritium wurde es von den Farbwerken Hoechst A.G. markiert. Die spezifische Aktivität beträgt 300 mC/g. Das Monomer und das Dimer von Cpd 48/80 wurden dankenswerterweise von Dr. K. H. Schmitt, Farbwerke Hoechst, synthetisiert. Dieser Prozess hätte die biologische Aktivität der Substanz verändern können. Um eine unterschiedliche Wirkung des heißen und des kalten Cpd 48/80 auszuschließen, wurden Zellkulturen mit einem riesenzellbildenden Herpes-

virusstamm infiziert. Zwei Stunden p.i. wurde Mediumwechsel vorgenommen. Anschließend wurden die Kulturen mit jeweils gleichen Gewichtsmengen von heißem oder von kaltem Cpd 48/80 versehen. Die RZB wurde durch beide Präparate im gleichen Dosisbereich verhindert (Tab.I). Heißes und kaltes Cpd 48/80 unterscheiden sich also hinsichtlich ihrer riesenzellhemmenden Wirkung nicht.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde - die Aminosäuren ausgenommen - in einem System durchgeführt, das besonders zur Auftrennung von Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin geeignet ist ("Standardsystem").

Als Dünnschichtplatten wurden Kieselgel-H-Platten der Firma Merck oder selbstgegossene Platten verwendet. Für das Gießen von 4 Platten wurde das Sorptionsmittel aus 36g Kieselgel-H und 4g Magnesium-trisilikat mit 80ml Wasser (vorher entgast) sorgfältig verrührt und mit einem Streichgerät der Firma Desaga auf die Platten aufgetragen. Die getrockneten Platten wurden bei 110-120°C 15 Minuten aktiviert. Das Laufmittelgemisch bestand aus 60ml Chloroform, 35ml Methanol und 4ml Wasser. Die Einteilung der Platten erfolgte mit einer Schablone von Stahl (14). Die Entwicklung wurde in Glasbehältern der Firma Desaga durchgeführt, die mit saugfähigem Papier ausgelegt waren, um einen möglichst gleichmäßigen Dampfdruck des Laufmittels zu erzielen. Die Auswertung der Platten erfolgte durch Anfärbung der Lipoid- und 48/80-Flecken mit Joddampf. Cpd 48/80 ließ sich ferner im Fluoreszenzlicht nachweisen.

Die Messung der Verteilung des radioaktiven Cpd 48/80 auf den Dünnschichtplatten erfolgte durch fraktioniertes Auskratzen der Sorptionsschicht im Bereich der Lipoidflecken bei anschließender Messung der Radioaktivität für die einzelnen Fraktionen im Tricarb-Scintillationsmessgerät. Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit wurden die erhaltenen Werte auf Prozentanteile der Gesamtaktivität in der ent-

sprechenden Laufstrecke umgerechnet.

Die Lipoidflecke wurden durch Testsubstanzen identifiziert.

Für die Chromatographie der Aminosäuren wurden Kieselgel-H-Platten der Firma Merck verwendet. Das Laufmittel war entweder aus 70 Anteilen Propanol und 40 Anteilen Ammoniak (25 %ig) oder aus 80 Anteilen Butanol, 20 Anteilen Eisessig und 20 Anteilen Wasser zusammengesetzt.

Messung der Radioaktivität

Zur Messung der Radioaktivität des Cpd ^3H -48/80 in den Fraktionen des Kieselgel-H wurden diese Fraktionen in Messampullen mit Bray'scher Lösung suspendiert. Gemessen wurde die Impulszahl pro 2 Minuten.

Um festzustellen, ob das Kieselgel einen Quench-Effekt ausübt, wurde in 4 Meßampullen jeweils die gleiche Menge einer ^3H -markierten Ölsäure inkubiert. In zwei dieser Ampullen wurde außerdem die einer Fraktion entsprechende Menge von Sorptionsmittel gegeben. Die Messung ergab für die einzelnen Ampullen keine significant unterschiedlichen Werte. Ein Quench-Effekt konnte also ausgeschlossen werden. Zur Messung wurde ein Gerät ("Tricarb") der Firma Packard, USA verwendet (Typ 3380).

Cholin-Einbau

^3H -markiertes Cholin wurde den Zellen angeboten (2,5 μC /10ml Kulturflüssigkeit). Die spezifische Aktivität der Substanz betrug 5-10 C/mM. Nach der Inkubation wurden die auf Petrischalen befindlichen Zellen einmal gewaschen, abgekratzt, sedimentiert, dann noch einmal gewaschen und schließlich in einem kleinen Volumen H_2O aufgenommen. Nach der Behandlung mit Ultraschall wurde ein aliquoter Teil für die Fällung des säure-unlöslichen Materials verwandt (TCE). Die Technik ist

anderenorts ausführlich beschrieben (5). Nachgespült wurde mit 5 %iger Na-Acetat-Lösung. Schließlich wurde die Radioaktivität des auf dem Filter befindlichen Materials bestimmt.

Spaltung der Lipide durch Enzyme

Die Enzymspaltung wurde in Meßampullen des Scintillationsmeßgerätes der Firma Packard mit einem Gemisch durchgeführt, das aus 5ml Äther, 0,2ml Enzymlösung, 0,15ml Methanol und 0,15ml Extrakt zusammengesetzt war. Das Enzym war in Wasser und der Lipoidextrakt in Methanol gelöst. Mit einem Magnetrührer wurde das Gemisch 6-7 Stunden bei einer Temperatur von 37°C gerührt (9). Anschließend wurde es zentrifugiert. Die lipophile Phase wurde dann mit einer Pipette abgenommen und im Wasserbad bei 37°C auf etwa 1/10 ihres Volumens eingengt. 0,1ml dieses Konzentrates wurde auf die Dünnschichtplatte zur Auswertung aufgetragen. Geprüft wurde die Phospholipase A und C. Als Phospholipase A wurde das Toxin von *Crotalus atrox* (Serva, Heidelberg) und als Phospholipase C ein Präparat der Firma Calbiochem, USA verwendet. In der hydrophilen Phase tritt als Spaltprodukt des Phospholipase-A-behandelten Lecithins Lysolecithin vermehrt auf.

Bindung von Cpd 48/80 an DNS

Reine DNS aus Fischspermien wurde zu 1mg/1ml im m/50 Tris-HCl-Puffer angesetzt. Das Monomer, das Dimer und Cpd 48/80 wurden gleichermaßen gelöst.

Zu je 10ml Tris-HCl-Puffer wurden 0,1ml DNS und/oder 0,1ml Substanz gegeben, im Reagenzglas gut gemischt und nach 20minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur in einem Zeiss-Spektrophotometer im Vergleich zu Tris-HCl-Puffer (Blindwert) gemessen. Nach dem gleichen Vorgehen wurde auch ribosomale RNS (Serva, Heidelberg) geprüft.

Kontrollversuche

Für die Arbeiten mit dem Lipoidextrakt war es notwendig, die in ihm enthaltenen Lipide zu identifizieren. Dies konnte durch Kontrollversuche auf Dünnschichtplatten erreicht werden. Dabei wurde der Extrakt im Standardsystem für Lipide (s. Abschnitt "Dünnschichtchromatographie") aufgetrennt. Zugleich mit dem Extrakt wurden auf denselben Dünnschichtplatten die Referenzsubstanzen, nämlich Sphingomyelin, Kephalin und Lecithin einzeln und als Gemisch aufgetragen. Nach der Auftrennung zeigte der Extrakt deutlich mit Jod anfärbbare Flecken, die in ihren R_f -werten mit den entsprechenden Jodflecken der Referenzsubstanzen übereinstimmten und damit als Sphingomyelin, Kephalin, Lecithin identifiziert werden konnten (Abb.1).

Eine weitere wichtige Kontrolle waren Versuche mit radioaktiv markierten Lipoidbestandteilen. So wurden ^3H -markierte Ölsäure, ^3H -Cholinchlorid und ^3H -Äthanolamin mit Kaninchennierenzellen inkubiert. Nach längerer Inkubation wurden die Zellen abgekratzt, sorgfältig gewaschen und, wie im Abschnitt "Extrakterstellung" angegeben, zu Lipoidextrakten verarbeitet. Die fertigen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Die Auswertung der Verteilungskurven der Radioaktivität ergab eindeutige Maxima in den Fraktionen der Lipoidflecken. Die Lokalisation der Verteilungsmaxima entsprach genau denjenigen Lipiden, in welche aufgrund ihres chemischen Aufbaues der Einbau der isotoopenmarkierten Substanzen zu erwarten war. Nach der Auftrennung des mit ^3H -Ölsäure markierten Lipoidextraktes war danach die Radioaktivität im wesentlichen in den Fraktionen zu finden, die Lecithin, Kephalin, Mono-, Di- und Tri-Glyceride enthielten. In entsprechender Weise war die Radioaktivität nach der Auftrennung des mit ^3H -Äthanolamin markierten Lipoidextraktes in der Kephalin- und in sehr geringer Menge auch in der Lecithinfraktion enthalten. Bei

dem mit ^3H -Cholinchlorid markierten Lipoidextrakt lagen die Maxima der Radioaktivität in der Sphingomyelin- und Lecithinfraktion. Durch diese Versuche ließ sich also deutlich zeigen, daß unsere Extrakte die genannten Lipide enthalten (Abb.2).

III. Ergebnisse

Bindung und Aufnahme von Cpd 48/80 durch die Zelle

Im hiesigen Laboratorium war früher festgestellt worden, daß Cpd 48/80 nach der Zugabe zu Kaninchennierenzellen nicht mehr auswaschbar ist (7). Darum wurde die Aufnahme und die Bindung des Cpd 48/80 durch die Zellen zunächst durch die Untersuchungen mit der tritium-markierten Verbindung studiert.

Versuch:

Kaninchennierenzellen wurden mit einer riesenzellbildenden Variante des Herpesvirus hominis infiziert. Zwei Stunden p.i. wurde das Imfivirus entfernt und ^3H -48/80 zugefügt. Acht Stunden p.i. war im Vergleich zu den Viruskontrollen wohl Zellabkugelung, aber keine RZB erkennbar.

Infizierte und zugleich mit ^3H -48/80 behandelte Parallelkulturen wurden abgekratzt, die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter (m/50) NaCl-Lösung (0,9 %; pH 7,2) gewaschen und ultrabeschallt. Aliquote Teile wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (12) und für die Messung der Radioaktivität verwendet.

Der ^3H -48/80-Gehalt wurde wie bei (5) nach der Fällung mit TCE bestimmt. Jedoch wurde das TCE-unlösliche Material nicht mit Alkohol, sondern mit 2,5 %iger Na-Acetatlösung (40ml) gewaschen, da mit dem Methanol auch das ^3H -48/80 ausgewaschen wird.

Die Messungen ergaben im Zellmaterial eine nicht auswaschbare Radioaktivität von 45 311 Impulsen pro Minute (l.p.M.) (obere Hälfte der Tabelle II). Das Cpd 48/80 wird also von der Zelle aufgenommen und fest gebunden.

Auch der Cholineinbau (hier nicht angeführt) war gegenüber den Kontrollen in dem erwarteten Ausmaß gehemmt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen zunächst 8 Stunden lang mit Cpd ^3H -48/80 inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Nach 24 Stunden wurde Virus zu den Zellen gegeben und nach 2 Stunden wieder ausgewaschen. 32 Stunden p.i. war geringgradige RZB und viel Zellabkuglung festzustellen. Die Zellen wurden dann, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und die Radioaktivität bestimmt. (Die Resultate sind im unteren Teil der Tab. II festgehalten.)

Das in den ersten 8 Stunden in die Zellen eingedrungene und nicht mehr auswaschbare Cpd ^3H -48/80 war also, wie die Radioaktivitätsmessung ergab, immer noch vorhanden. Aus der geringgradigen RZB ist zu ersehen, daß das einmal von der Zelle aufgenommene Cpd ^3H -48/80 die RZB immer noch partiell hemmt, so daß die Zellabkuglung noch zustande kommt. Desgleichen wird die Penetration des Virus immer noch gestört: Der zytopathische Effekt (ZPE) erfaßt nicht den gesamten Zellrasen.

Versuch:

In einem 2. Versuch wurde geprüft, ob ^3H -48/80 wirklich aus der Kulturflüssigkeit in die Zellen übergeht. Pro 10ml Kulturflüssigkeit wurden 10µg ^3H -48/80 eingesetzt. wie aus der Tabelle III hervorgeht, sinkt die Radioaktivität im Kulturüberstand deutlich ab. Dies bedeutet, daß ^3H -48/80 tatsächlich von den Zellen aufgenommen wird. Umgekehrt konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, daß die Menge des zellgebundenen ^3H -48/80 steigt (Tab. IV). Mit Kaninchennierenzellen bewachsene Petrischalen wurden dazu mit 10µg ^3H -48/80 beschickt, verschieden lang bei 37°C bebrütet und dann wie beschrieben aufgearbeitet.

Die summarische Beobachtung, daß Cpd 48/80 nicht auswaschbar ist (7), erhält also durch diese Ergebnisse eine sichere Stütze. Wie sich in früheren Versuchen des hiesigen Laboratoriums herausgestellt hatte (6), ist dies eine Besonderheit des Cpd 48/80; andere Substanzen, wie z.B. Heparin, hemmen

nämlich ebenfalls die Riesenzellbildung und die Penetration, sind aber leicht auswaschbar.

Es erschien nun interessant, die Bindung von Cpd 48/80 an die Zelle und die Dauer seiner Wirksamkeit zu studieren.

Versuch:

Kulturen (Petrischalen) mit Kaninchennierenzellen wurden 8 Stunden lang mit $25\mu\text{g}$ 48/80 pro ml behandelt. Zu einigen Kulturen wurde in der 7. und 8. Stunde ^3H -Cholin ($2,5\mu\text{C}$ pro 10ml) gegeben (mit den entsprechenden Kontrollen) und die Zellen zur Bestimmung des eingebauten Materials aufgearbeitet (Tab. V). Die übrigen Kulturen wurden (einschließlich der Kontrollen) 3mal gewaschen und weiter inkubiert. Weitere Markierungen mit ^3H -Cholin erfolgten 10 - 11 Stunden und 24 - 25 Stunden nach Versuchsbeginn.

Die Versuche zeigen, daß nach dem Auswaschen von 48/80 die Hemmung gegenüber dem Cholineinbau zunächst noch deutlich nachweisbar ist, einige Stunden später aber völlig verschwunden ist. Offenbar war 48/80 zunächst fest von der Zelle gebunden und entfaltet seine Wirkungen. Direkt nach dem Auswaschen ist seine Radioaktivität noch vorhanden. In der Zelle wird Cpd 48/80 jedoch im Laufe einiger Stunden unwirksam. Möglicherweise wird es in der Zelle metabolisiert oder sekundär in einer Art gebunden, daß es unwirksam wird bzw. einem Abbau anheimfällt.

In Anbetracht der Wirkung von Cpd 48/80 auf die Lecithinbiosynthese und seiner als Membraneffekt deutbaren Hemmung der RZB sowie auch seiner Wirksamkeit als Aktivator von Lysosomen, entschlossen wir uns, die Lipooide der Zellen zu extrahieren und nach dem Verbleib des ^3H -48/80 zu fahnden.

"Bilanzversuche" mit Compound 48/80 bei der Lipoidextraktion

Für die Bedeutung und Aussagekraft der folgenden Versuche über die Wirkung des Compound 48/80 in der Zelle war es notwendig, einen Extrakt zu gewinnen, der im wesentlichen das in die Zelle eingedrungene Cpd 48/80 enthielt. Um festzustellen, ob der verwendete Lipoidextrakt tatsächlich ^3H -48/80 enthält, wurden Messungen mit radioaktivem Cpd 48/80 durchgeführt.

Versuch:

Zu beschallten Zellen aus 5 Roux-Flaschen wurde eine definierte Menge radioaktives Cpd 48/80 zugegeben. Das Lyophilisat wurde, wie in "Material und Methoden" beschrieben, in 15ml eines Chloroform-Methanolgemisches aufgelöst, filtriert, eingedampft und in 3ml Methanol aufgenommen (Extrakt M 1951). Gemessen wurde die Gesamtaktivität des Extraktes sowie die Radioaktivität des Filtrerrückstandes, also aller Zellbestandteile, die nicht im Extrakt enthalten waren. Die Summe beider Werte müßte, wenn keine Verluste aufträten, gleich der eingesetzten Radioaktivität sein. Hierbei zeigte sich, daß die Verluste des an Kolben, Trichter und Pipetten adsorbierten ^3H -48/80 etwa die Hälfte der eingebrachten Menge betragen. Die Radioaktivität im Filter betrug 6,79 % der des Gesamt-Extraktes. Cpd 48/80 bleibt also bei der Extraktion mit Lipoidlösungsmitteln nicht an die übrigen Zellbestandteile gebunden, sondern geht fast ausschließlich in den Lipoidextrakt über.

Bei der Herstellung eines weiteren Extraktes (Extrakt M 1950) wurde unter sonst gleichen Bedingungen das Lyophilisat nur mit 5ml des Chloroform-Methanolgemisches aufgenommen und verarbeitet. Hier betrug die Menge des Cpd 48/80 im Filtrerrückstand über 19 % des im Extrakt enthaltenen Cpd 48/80. Das Cpd 48/80 läßt sich also aus dem Filtrerrückstand in Abhängigkeit von der Menge des verwendeten Chloroform-Methanolgemisches in den Extrakt überführen. Darum wurden auch, wie in

"Material und Methoden" angegeben, bei der Herstellung späterer Extrakte größere Mengen des Chloroform-Methanolgemisches (z.B. beim Extrakt M 1700) verwendet (Tab.VI).

Wenn der Extrakt aus Zellen hergestellt wurde, die vorher Cpd 48/80 erhalten hatten, konnte Cpd 48/80 auch aus dem Filtrerrückstand ausgewaschen werden:

Versuch:

Es wurden die Zellen aus 15 Roux-Flaschen, die 16 - 17 Stunden mit Cpd ^3H -48/80 inkubiert waren, nach den Angaben in "Material und Methoden" abgekratzt, gewaschen, ultrabeschallt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat mit 150ml des Chloroform-Methanolgemisches filtriert. Das Filtrat wurde in 3 Fraktionen von je 50ml abgenommen. Die Radioaktivitätsmessung ergab eine kontinuierliche Minderung der Werte von der ersten zur dritten Fraktion jeweils um den Faktor 10 (1. Fraktion 2884850 cpm, 2. Fraktion 232600 cpm, 3. Fraktion 21650 cpm). Die Radioaktivität des Filters betrug 1,7 % des fertigen Gesamtextraktes. Auch diese Messungen zeigen deutlich, daß Cpd ^3H -48/80 in Abhängigkeit von der Menge des verwendeten Chloroform-Methanolgemisches aus dem Filtrerrückstand in den Extrakt überführt werden kann.

Es darf also nach diesen Messungen eine methanol- und chloroformbeständige Bindung des Cpd 48/80 an die nicht im Extrakt enthaltenen Zellbestandteile ausgeschlossen werden, da das Cpd 48/80 aus dem Filtrerrückstand, der diese Zellbestandteile enthält, mit dem Chloroform-Methanolgemisch auswaschbar ist.

Dünnschichtchromatographische Eigenschaften des Cpd 48/80

Im vorherigen Abschnitt war gezeigt worden, daß Cpd 48/80 fest von der Zelle gebunden wird und in den Lipoidextrakt übergeht.

Vor der dünnschichtchromatographischen Untersuchung dieses Extraktes wurde zunächst das Verhalten von Cpd 48/80 unter verschiedenen Bedingungen studiert. Bei diesen Versuchen wurde von einem Laufmittelsystem ausgegangen, das die Auftrennung von Lipoiden gestattet; es bestand aus mit Wasser gegossenen Kieselgel-H-Platten mit Zusatz von Mg-Trisilikat oder käuflichen Kieselgel-H-Platten der Firma Merck und einem Laufmittel der Zusammensetzung Chloroform, Methanol, Wasser im Verhältnis 65 : 35 (25) : 4 (Standardsystem).

Unter diesen Bedingungen lag nach der Chromatographie des in Methanol gelösten Cpd 48/80 das Maximum der Verteilung der Radioaktivität auf beiden Dünnschichtplatten in der 1. Fraktion. Das Cpd 48/80 blieb also im wesentlichen am Startpunkt liegen (Abb.3).

Durch Veränderungen des pH-Wertes mit Natronlauge und Ammoniak im Standardsystem wurden die Laufeigenschaften des Cpd 48/80 verändert.

Als Lösungsmittel für die Sorptionssubstanzen wurde beim Gießen der Platten zunächst Natronlauge in steigenden Konzentrationen verwendet. Auf diesen mit Natronlauge gegossenen Platten wurde Cpd 48/80 mit dem Standardlaufmittel chromatographiert. Bei der Auswertung der Versuche zeigte sich, daß mit steigenden Konzentrationen der Natronlauge das ^3H -48/80 auf der Dünnschichtplatte zunehmend in Richtung der Laufmittelfront wanderte. Mit 1n-Natronlauge trat etwas hinter der Laufmittelfront ein deutliches Maximum auf (Abb.4).

Es ist hierbei wichtig, daß bei einer mittleren Konzentration von Natronlauge (0,5n) in der Verteilungskurve das ^3H -48/80 über die gesamte Laufstrecke verteilt war. Durch Ver-

Änderung des pH-Wertes im Standardsystem ist es also, abgesehen von den beiden Extremwerten (Maximum in der 1. und der vorletzten Fraktion), nicht möglich, eine allmähliche Verschiebung des Maximums der Verteilung des Cpd 48/80 zu erreichen - die Substanz "verschmiert". So war es nicht möglich, eventuell wichtige Differenzierungen gegenüber anderen Substanzen mit etwa gleichem RF-Wert durchführen zu können.

Auch bei Veränderung des pH-Wertes mit Ammoniak waren die Ergebnisse gleichartig. Ammoniak wurde jedoch nicht als Lösungsmittel für die Sorptionssubstanzen verwendet, sondern dem Laufmittel anstelle von Wasser beigelegt. Ein eindeutiges Maximum in geringerem Abstand von der Laufmittelfront konnte mit 10 Anteilen von 25%igem Ammoniak erreicht werden. Andere Laufmittelzusammensetzungen erwiesen sich aber als völlig ungeeignet, um die Laufeigenschaften von Cpd 48/80 zu studieren. Auch der Zusatz von Eisessig (1-4 %) ergab keine Trennungen in verschiedene Fraktionen (Abb.5).

Chromatographische Untersuchung eines Lipoidextraktes mit Cpd ^3H -48/80

Nachdem im vorherigen Abschnitt das dünnschichtchromatographische Verhalten von Cpd 48/80 unter verschiedenen Bedingungen eruiert worden war, wurde nun im Standardsystem untersucht, wie das im Lipoidextrakt befindliche Cpd ^3H -48/80 auf Dünnschichtplatten läuft. Mit diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob sich die Laufeigenschaften des Cpd 48/80 durch eine Reaktion mit den Substanzen des Lipoidextraktes oder durch einen chemischen Umbau in der Zelle geändert hatten. Wie beschrieben, verliert das Cpd 48/80 in der Zelle nach einigen Stunden seine Wirksamkeit.

Versuch:

50 µg des Cpd ^3H -48/80 wurden vor der Extrakterstellung mit den in einer Roux-Flasche gewachsenen Zellen 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nährlösung abgegossen und der Zellrasen mit NaCl-Phosphatpuffer gespült, um nicht in die Zellen eingedrungenes Cpd ^3H -48/80

und Reste der Nährlösung weitgehend zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in NaCl-Phosphatpuffer abgekratzt und bei 4000 U/min abzentrifugiert. Der Puffer wurde abgegossen und das Zentrifugat in wasser aufgenommen. Auf diese Weise wurde in den weiteren Untersuchungen nur noch das von den Zellen aufgenommene Cpd ^3H -48/80 erfaßt. Die Zellen wurden dann, wie in "Material und Methoden" angegeben, weiter zum Extrakt verarbeitet. 0,05ml des Extraktes wurden im Standardsystem chromatographiert und die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 auf der Dünnschichtplatte ermittelt.

Die Verteilung des im Extrakt enthaltenen Cpd ^3H -48/80 unterschied sich deutlich von der der ^3H -48/80 Kontrolle. Während das Verteilungsmaximum des ^3H -48/80-Kontrollpräparates - wie im vorigen Abschnitt ausgeführt - in der 1. Fraktion lag, traten nun ein Maximum in der 4. und ein Maximum in der 6. Fraktion auf. Der Peak in der 4. Fraktion enthielt den weitaus größten Teil der Radioaktivität. In den übrigen Fraktionen war die Radioaktivität sehr gering (Abb.6).

Die Verteilungsmaxima des im Lipoidextrakt enthaltenen Cpd ^3H -48/80 lassen sich in kleinen Bereichen scharf abgrenzen. Das Cpd ^3H -48/80 ist also nicht über die Platte verschmiert, sondern scharf auf zwei Flecke begrenzt, denen eindeutige RF-Werte von 30 und 50 zukommen (15).

Diese Versuche haben gezeigt, daß die chromatographischen Eigenschaften von Cpd 48/80, wenn es mit lebenden Kulturzellen in Verbindung gekommen war, "verändert" werden. Durch weitere Untersuchungen sollte nach Möglichkeit die Ursache hierfür festgestellt werden.

Chromatographie von Mischungen des Cpd ^3H -48/80 mit Sub-
stanzen des Lipoidextraktes

Zur Erklärung für die im vorherigen Abschnitt beschriebene Änderung der chromatographischen Eigenschaften von Cpd 48/80 bieten sich mehrere Möglichkeiten an.

Zunächst wäre eine Reaktion der funktionellen Gruppen der Substanzen (negativ-geladene Phosphatreste) des Lipoidextraktes, insbesondere der Lipide, mit der funktionellen Gruppe ($-\text{NH}_2$) des Cpd 48/80 zu diskutieren. Durch eine Reaktion, die zu einer Änderung der Polarität von Cpd 48/80 führen würde, könnte die Änderung des RF-wertes erklärt werden, da die Reihenfolge der Trennung der Verbindungen nach der Polarität ihrer funktionellen Gruppen erfolgt (14). - Die Erhöhung des RF-wertes von Cpd 48/80 durch eine direkte Bindung an die Lipide erscheint wenig wahrscheinlich, da die RF-Werte der Lipide des Extraktes gegenüber den RF-Werten der Kontroll-Lipide nicht signifikant verändert waren. Bei einer solchen Bindung des Cpd 48/80 an Lipide hätte man eine deutliche Änderung des RF-wertes derselben erwarten müssen. - Auch eine chemische Veränderung des Cpd 48/80 durch die Zelle wäre möglich. Eine chemische Veränderung des Moleküls würde dann ebenfalls zu anderen Laufeigenschaften von Cpd 48/80 führen.

Im weiteren Gang der Untersuchungen wurde Cpd 48/80 zunächst mit Verbindungen, die im Extrakt enthalten waren, oder die diesen chemisch ähnlich waren, gemischt. Diese Gemische wurden im Standardsystem chromatographiert und anschließend die Verteilung des ^3H -48/80 ermittelt.

Durch diese Versuche sollte festgestellt werden, ob die im vorigen Abschnitt festgestellte Änderung des im Lipoidextrakt enthaltenen Cpd 48/80 durch eine Reaktion mit diesen Stoffen bewirkt wird. So wurden Mischungen des in Methanol gelösten Cpd ^3H -48/80 mit Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin geprüft. Auch ein Gemisch von Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin mit Cpd ^3H -48/80, das ebenfalls in Methanol gelöst war, wurde

untersucht. In allen Fällen ergab die Verteilung des in den Mischungen enthaltenen Cpd ^3H -48/80 keine signifikanten Unterschiede zu der Verteilung des Kontrollpräparates. Immer blieb das ^3H -48/80 an den Startpunkten liegen. Entsprechende Untersuchungen der in Wasser löslichen Lipoidbausteine, wie Ortho-Phosphoäthanolamin, Phospho-Cholinchlorid, Äthanolamin-HCl und von Cholin-Cl führte zum gleichen Ergebnis.

Da die oben beschriebenen Mischungen nur bei Zimmertemperatur angesetzt wurden, war es notwendig, auch den Einfluß der Temperatur und des Zeitfaktors auszuschließen. Darum wurden auch Mischungen von Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin bei 37°C mit Cpd ^3H -48/80 16 Stunden lang inkubiert und anschließend chromatographiert. Ein Gemisch von Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin, dem auch ^3H -48/80 zugegeben wurde, zeigte nach 14tägiger Inkubation bei 37°C - ebenso wie die 16 Stunden inkubierten Mischungen - nach seiner Auftrennung im Standardsystem keine Veränderung der Verteilung des ^3H -48/80.

Mit dem Lowry-Test konnten wir in den eingeeengten Lipoidextrakten geringe Mengen von Proteinen nachweisen. Um die Möglichkeit der Verschiebung des RF-wertes des Cpd 48/80 durch diese das Filter passierenden Proteine auszuschließen, wurden Rinderalbumin, Humanalbumin, Rinderglobulin, Cytochrom C und die Lipoid-spaltenden Enzyme Phospholipase A, Phospholipase C und Lipase ebenso wie die Lipide getestet. Die Enzyme wurden in NaCl-Phosphat-Puffer und die übrigen Proteine in Wasser gelöst. Hierdurch sollte eine Denaturierung der Proteine verhindert und eine bessere Löslichkeit erreicht werden.

Phospholipase A, Phospholipase C und Lipase aus Weizenkeimlingen wurden gewählt, um die Möglichkeit einer spontanen Bindung an Lipoid-spaltende Enzyme und damit das Eingreifen des Cpd 48/80 in entsprechende enzymatische Reaktionen zu testen. Obwohl das Lipoid-Laufmittelsystem (Standardsystem) für Protein-Trennungen nicht geeignet ist, wurde es gewählt, weil die Erhöhung des RF-Wertes von 48/80 in eben diesem Systeme

nachweisbar war und die Ergebnisse mit den vorherigen Versuchen dann direkt vergleichbar waren. Auch hier war kein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Aktivitätsverteilung des Cpd 48/80 festzustellen. Aus diesen Versuchen kann auf das Verhalten der Proteine bei den in vitro kultivierten Zellen nicht geschlossen werden. Doch ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein Zellprotein für den veränderten RF-Wert des Cpd 48/80 im Extrakt verantwortlich ist, diesen Versuchen zufolge gering.

Auch Aminosäuren, die leicht in den Extrakt übergehen können, wurden geprüft. Mischungen der in wasser gelösten Aminosäuren Arginin, Histidin, Lysin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin und Phenylalanin mit Cpd ^3H -48/80 wurden in den in "Material und Methoden" angegebenen Systemen chromatographiert. Die Verteilung der Radioaktivität auf den Platten ergab ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Arginin, Histidin, Lysin, Glutaminsäure und Asparaginsäure wurden für diese Versuche gewählt, um eine Reaktion der polaren Gruppen dieser Säuren mit der Iminogruppe des Cpd 48/80 auszuschließen. Insgesamt haben diese Versuche keine Ergebnisse erbracht, welche eine Reaktion zwischen den untersuchten Substanzen mit Cpd ^3H -48/80 wahrscheinlich machen konnten.

Eine Erklärung für die Veränderung der Verteilung des Cpd ^3H -48/80 nach Inkubation mit den Kulturzellen ließ sich also nicht erbringen.

5.2. Zellfreie Systeme zur Analyse eines Extraktes mit Cpd 48/80 und chromatographische Untersuchung der Spalte

Der Wirkungsmechanismus des Cpd 48/80 hinsichtlich der Hemmung der Riesenzellbildung könnte auf Interaktionen mit Zelllipoiden beruhen. Darum wurde bei den folgenden Versuchen noch einmal auf andere Weise untersucht, ob eine Reaktion

der Lipide der Zelle mit dem Cpd 48/80 die Ursache für die veränderte Verteilung seiner Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte ist. Folgende Überlegungen lagen den Versuchen zugrunde:

wenn die Lipide des Extraktes enzymatisch gespalten werden, so haben die Spaltprodukte nach ihrer Trennung auf der dünnen Schicht andere RF-Werte als die Lipide. wenn die Änderung der Verteilung des Cpd 48/80 die Folge einer Reaktion mit den Lipiden, insbesondere mit ihren polaren Gruppen ist, so wäre nach ihrer Spaltung auch eine Änderung des RF-Wertes von Cpd 48/80 zu erwarten. Durch die unveränderte Position der Lipide nach der Chromatographie von Extrakten mit Cpd ^3H -48/80 wurde aber trotz der Änderung der Verteilung von Cpd ^3H -48/80 nach Zellkontakt eine methanolbeständige Bindung von ^3H -48/80 an die Lipide unwahrscheinlich. Für das Vorliegen einer Bindung schien jedoch zu sprechen, daß die RF-Werte von Cpd ^3H -48/80 und des Lecithins keine deutlichen Unterschiede erkennen ließen, wenn ^3H -48/80 mit Zellen in Berührung gekommen war. Durch die Spaltungsversuche mit Enzymen wäre es aber möglich, eine spontane oder aktiv durch die Zelle entstandene Bindung des Cpd 48/80 an Lipide sicher auszuschließen. Würde nämlich die Erhöhung des RF-Wertes des Cpd 48/80 durch eine solche Bindung erfolgen, so müßte sich nach der enzymatischen Spaltung der RF-Wert des Cpd 48/80 ändern. Das würde sowohl für den Fall gelten, daß Cpd 48/80 an eines der Spaltprodukte gebunden bleibt (diese haben nach der Spaltung andere RF-Werte als die Lipide), als auch für den Fall, daß die Bindung von Cpd 48/80 durch die Spaltung gelöst wird und so sein RF-Wert nun wieder dem der Kontrolle entspricht.

Versuch:

Der Versuch wurde mit Lipoidextrakten aus solchen Zellen durchgeführt, die vor der Beschallung bei 37°C acht Stunden mit Cpd ^3H -48/80 inkubiert worden waren. Für eine Roux-Flasche wurden 5,0 μg Cpd ^3H -48/80 eingesetzt. Mit dem Toxin von

Crotalus atrox wurde der Lipoidextrakt gespalten. Das Spaltgemisch enthielt 0,15ml Extrakt, 0,2ml in Wasser gelöstes Enzym (3mg/1ml H₂O), 5ml Äther und 0,15ml Methanol (9).

Sichere Aussagen waren nur durch Mitführen entsprechender Kontrollen möglich. So wurden Kontrollversuche angesetzt, in denen die Enzymlösung durch Wasser oder in denen der Extraktanteil durch in Methanol gelöstes Cpd ³H-48/80 ersetzt war. Außerdem wurde als Null-wert ein Ansatz mitgeführt, der erst unmittelbar vor dem Auftragen hergestellt wurde. Das Spaltgemisch und die Kontrollen wurden 14 Stunden lang mit einem Magnetrührer bei Zimmertemperatur (21 - 24°C) gerührt und anschließend zugleich mit dem "Null-wert" angereichert. Von jedem Konzentrat wurde 0,1ml im Standardsystem chromatographiert.

Bei der Auswertung der Chromatogramme fiel auf, daß die Verteilung der Radioaktivität der Spaltgemische im Vergleich zu den Verteilungskurven des einfachen Extraktes deutlich verändert waren. Es trat nicht mehr ein Maximum in der 4. Fraktion auf. Dafür war ein großes Maximum in der 1. Fraktion entstanden. Das zum Spaltgemisch gehörige Maximum, welches dem Maximum des einfachen Extraktes in der 6. Fraktion entsprach, war auf die 5. und 6. Fraktion verbreitert. Diese Veränderungen lassen sich gut durch den später (Abschnitt 7) gefundenen Einfluß von Ionen auf die Verteilung des Cpd ³H-48/80 auf der Dünnschichtplatte erklären, da im konzentrierten Spaltgemisch die Ionenzusammensetzung gegenüber dem einfachen Lipoidextrakt mit Cpd ³H-48/80 wesentlich verändert ist (Abb.7).

Die ³H-48/80 Verteilung der Nullkontrolle und des Ansatzes, der anstelle der Enzymlösung nur Wasser erhalten hatte, waren identisch. Es war ohne Einfluß, ob im Spaltgemisch eine Spaltung erfolgt war, oder ob sie wie beim Null-wert und der Kontrolle ausgeblieben war. Nur die Kontrolle, in der

der Extrakt durch in Methanol gelöstes Cpd ^3H -48/80 ersetzt war, zeigte erwartungsgemäß ein anderes Bild.

Die Bedingungen für die Spaltung wurden durch eine Variation des Methanol- und wasseranteils am Spaltgemisch genauer untersucht. Bei diesen Versuchen wurde ein in Methanol gelöstes Gemisch von Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin mit Cpd ^3H -48/80 gespalten. Die Spaltung und die anschließende Trennung der Spaltprodukte wurde - wie oben beschrieben - durchgeführt.

Beim Vergleich der Verteilung von Cpd ^3H -48/80 ergab sich ein Unterschied je nachdem, ob ein Gemisch von Lipoiden mit Cpd ^3H -48/80 oder ein Extrakt aus Zellen, die mit Cpd ^3H -48/80 inkubiert waren, chromatographiert worden war. Die Kontrollkurven von Cpd ^3H -48/80 und die Kurve für das Gemisch von Lipoiden mit Cpd ^3H -48/80 zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb.8). Es konnte nun untersucht werden, wie sich die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 bei Modifikationen des Spaltgemisches ändert. Dabei diente das Auftreten der Lipide als Indikator für die enzymatische Spaltung. Der Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war das bei der Hauptspaltung verwendete Gemisch mit einem Anteil von 3ml Methanol, in dem die Lipide und das Cpd ^3H -48/80 gelöst waren, und einem Anteil von 2ml Wasser, in dem das Enzym gelöst war. Bei einer Verminderung des Methanolanteils verminderte sich das Maximum in der 1. Fraktion. Dafür trat ein deutliches Maximum in der 3. und 4. Fraktion auf. Gleichzeitig konnte eine deutliche Verbesserung der Spaltung festgestellt werden (Abb.9).

Die Erhöhung des wasseranteils hatte den gleichen Effekt. Auch hier erfolgte eine Verschiebung der Radioaktivität vom 1. zum 2. Maximum und eine deutliche Verbesserung der Spaltung (Abb.10) (Tab.VII).

Durch diese Versuche konnte ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung des RF-Wertes von Cpd 48/80 durch eine Bindung an die Lipide verursacht wird, da die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 mit und ohne Spaltung der Lipide den gleichen Verlauf zeigt.

Bei den bisherigen Versuchen konnte eine Reaktion des Cpd 48/80 mit Substanzen des Lipoidextraktes nicht nachgewiesen und eine methanolbeständige Bindung des Cpd 48/80 an die Zell-Lipide ausgeschlossen werden. Um weitere Informationen für die Art der "Veränderung" von Cpd 48/80 durch die Zellen zu gewinnen, wurden die Bedingungen, die zu einer Veränderung der Verteilung von Cpd ^3H -48/80 führen, weiter untersucht.

Das Cpd ^3H -48/80 wurde den Extrakten in verschiedenen Phasen der Herstellung zugefügt. Dabei wurde die Zeitdauer der Zugabe und die Temperatur in verschiedener Weise variiert. Da diese Versuche keine weiteren Aufschlüsse über die zellbedingte Veränderung von Cpd 48/80 erbrachten, soll nur summarisch berichtet werden, daß nicht nur die Zugabe von 48/80 zu intakten Zellen, sondern auch zu ultrabeschalltem Zellmaterial oder zum fertigen Extrakt - gleichgültig, ob bei $+4^\circ\text{C}$, 24°C oder 37°C - die oben beschriebene "Veränderung" der Substanz ergab. Ebenso war der Zeitfaktor ohne Einfluß. Es wurde deshalb die Arbeitshypothese aufgestellt, daß eventuell eine Verbindung mit Ionen, wie z.B. Cl^- oder PO_4^{3-} , erfolgt. Durch solch eine "Bindung" könnte gegebenenfalls ebenso der RF-Wert von Cpd 48/80 steigen.

Abb. 103: Dünnschichtplatte und die Reaktion mit DNS

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Veränderung der Verteilung von Cpd ^3H -48/80 auf der dünnen Schicht durch Substanzen hervorgerufen wird, die im fertigen Lipoidextrakt vorhanden sind. Ein direkter Einfluß der Lipide auf das Cpd 48/80 konnte ausgeschlossen werden. Ein Ein-

fluß von Proteinen oder Aminosäuren war unwahrscheinlich geworden. So lag es nahe, den Einfluß von Ionen auf die chromatographischen Eigenschaften zu prüfen. Dies erschien besonders deshalb aussichtsreich, weil ein Teil der in der Zelle befindlichen Ionen im Extrakt enthalten sein konnte und eine Reaktion besonders mit der Iminogruppe des Cpd ^3H -48/80 denkbar ist. Schließlich änderete sich der RF-Wert des Cpd ^3H -48/80 unabhängig von Temperatur und Zeit. In den folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob durch Mischungen des Cpd ^3H -48/80 mit in Lösung befindlichen Ionen eine Veränderung der ^3H -48/80-Verteilung auftritt.

Versuch:

Für die ersten Versuche wurde der bei der Extrakterstellung verwendete Puffer verwandt. Der Puffer war 0,9 %ig an NaCl, 0,17 %ig an Na_2HPO_4 und 0,02 %ig an KH_2PO_4 . Drei Mischungen von Cpd ^3H -48/80 und Puffer wurden untersucht. Die erste Mischung enthielt 20 %, die zweite 50 % und die dritte 80 % Puffer. Der Rest der Mischungen bestand aus destilliertem Wasser, in dem 2 % von Cpd ^3H -48/80 gelöst waren. Ihr Gesamtvolumen betrug je 0,5 ml; 0,02 ml jeder Mischung wurden chromatographiert und die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 ermittelt (Abb. 11).

Die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 ergab, daß beim Ansatz mit 20 % Pufferanteil in der 1. Fraktion der größte Teil der Gesamtradioaktivität enthalten war. Die entsprechende Kurve besitzt eine gewisse Ähnlichkeit mit der Kontrollkurve, bei der fast die gesamte Radioaktivität in der 1. Fraktion enthalten ist (Abb. 3). Andererseits aber ergibt sich im genannten Versuch außer dem ersten Maximum ein weiteres Maximum. Mit steigender Pufferkonzentration wanderte in den Kurven bei den 1. Fraktionen der beiden anderen Mischungen der weitestgrößte Teil der Radioaktivität der 1. Fraktion von dem ersten Maximum des Grundversuches in das zweite Maximum.

In der 6. Fraktion war kein Maximum zu erkennen. Die Kurve der Mischung mit dem Pufferanteil von 80 % zeigte nur geringe Abweichungen von den Kurven der Lipoidextrakte mit Cpd ^3H -48/80 (s. Abb. 6). Als charakteristische Abweichung kann das völlige Fehlen eines Maximums in der 6. Fraktion gewertet werden. Durch Erhöhung der Pufferkonzentration war es also möglich, die Kurve der Kontrolle des Cpd ^3H -48/80 in gleicher Weise zu verändern, wie es auch durch Substanzen des Lipoidextraktes möglich war. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß bei den früheren Versuchen Ionen die Veränderung der Verteilungskurve des Cpd ^3H -48/80 verursacht hatten.

In weiteren Untersuchungen wurde versucht, die Wirkung der im Puffer enthaltenen Ionen auf die Änderung der Verteilungskurve des Cpd ^3H -48/80 zu differenzieren. Es wurden Lösungen hergestellt, die NaCl bzw. Na_2HPO_4 und K_2HPO_4 in gleicher Konzentration wie im Puffer enthielten. Mit diesen Lösungen wurden entsprechend dem vorigen Versuch Mischungen mit dem Cpd ^3H -48/80 hergestellt. 0,02 ml der Mischungen wurden chromatographiert und die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 ermittelt. Die Verteilung des ^3H -48/80 im Ansatz mit Phosphationen zeigte trotz unterschiedlicher Salzkonzentrationen die gleichen Verläufe wie in der Kontrolle. Das Maximum der Radioaktivität lag in der 1. Fraktion. Die Radioaktivität verteilte sich jedoch sehr viel stärker als bei der Kontrolle auf die übrigen Fraktionen (Abb. 12).

Die Verteilung des ^3H -48/80-Ansatzes mit Natriumchlorid entsprach jedoch denen der Puffermischungen. Mit steigender Salzkonzentration verschob sich die Radioaktivität von der 1. in die 4. Fraktion, in der auch beim Grundversuch das 1. Maximum lag (Abb. 13).

Diesen Versuchen zufolge ist es sehr wahrscheinlich, daß die Chlorionen der Zelle die Veränderung der Verteilung des Cpd ^3H -48/80 bewirken.

Versuch:

Um zu zeigen, daß die Laufeigenschaften des Cpd ^3H -48/80 durch die Cl-Ionen der Zellen verändert werden, wurden Kanimchennierenzellen mit Cpd ^3H -48/80 inkubiert. Die Zellen wurden wie üblich aufgearbeitet, das Sediment jedoch 3 x intensiv mit wasser gewaschen und erst dann ultrabeschallt und extrahiert. Beim waschen kam es durch den osmotischen Druck zu einer Zerstörung der Zellmembranen und zu einem Austritt von Zellionen in das umgebende wasser. Diese Zellionen wurden nach der bei jedem waschvorgang durchgeführten Zentrifugation mit dem Überstand abgegossen. Auf diese weise wurden auch die Chlorionen der Zellen weitgehend aus dem Extrakt entfernt. Die Wanderungseigenschaften des Cpd ^3H -48/80 in diesem Extrakt unterschieden sich nicht wesentlich von denen der 48/80 Kontrolle. Nur das Maximum in der 6. Fraktion (s. Abb. 6) war erhalten geblieben. Damit war sehr wahrscheinlich geworden, daß tatsächlich die Cl-Ionen der Zellen den RF-Wert von 48/80 beeinflussen.

Eine solche Wirkung könnte auch durch Phosphat-Ionen hervorgerufen werden. Indessen konnten wir diesen Effekt nicht nachweisen; möglicherweise könnte das aber auch durch die Zusammensetzung des Laufmittelgemisches bedingt sein, das eine wanderung des Komplexes von 48/80 und Phosphat-Ionen nicht gestattet. Wir haben deswegen versucht, die Bindung an oder mit Phosphat-Resten auf andere weise nachzuweisen. Als Indikator bot sich DNS an, die mit Diaminen - je nach ihrer Kettenlänge - reagiert (10). wir haben deshalb das Monomer des Cpd 48/80, das Dimer und Cpd 48/80 selbst mit DNS in Tris-HCL-Puffer (pH 7,2) reagieren lassen und die UV-Spektren gemessen (Abb. 14).

Die Abbildung 14 zeigt, daß Cpd 48/80 eine Ernöhung des Spektrums ergibt, nicht aber das Monomer und das Dimer. Dies

ließ sich bereits mit bloßem Auge beobachten, insofern, als eine Trübung der entsprechenden Proben auftrat. Eine salzartige Bindung ist deshalb wahrscheinlich, weil hohe Konzentrationen von NaCl (0,5 und 1,0 m) diese Reaktion verhindern. Es läßt sich folgern, daß auch PO_4 -Ionen mit Cpd 48/80 reagieren. Indessen müssen die Molekülbestandteile des 48/80 eine bestimmte Größe haben, um mit den Phosphatresten reagieren zu können. Tatsächlich gehen - wie sich ergab - das Monomer und das Dimer keine Bindung ein, d.h. die Absorption erhöht sich nicht. Außerdem ist kein Präzipitat zu beobachten. - Ribosomale RNS reagierte nicht. Die Versuche zeigen also, daß 48/80 mit Cl und wahrscheinlich auch mit PO_4 -Ionen Bindungen eingehen oder mit ihnen reagieren kann.

Wichtig ist ferner die Beobachtung, daß das Dimer - also ein kleines Molekül - sich nicht an die LNS bindet. Offenbar ist der Abstand zwischen den bindungsaktiven Gruppen des Dimers nicht groß genug, um die Abstände zwischen den Phosphatresten der Doppelhelix zu überbrücken.

IV. Diskussion

Die Untersuchungen in der hiesigen Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß der seit langer Zeit in der experimentellen Allergieforschung benutzte Histaminliberator Cpd 48/80 (13) weitere, bisher nicht bekannte Wirkungen besitzt. So hat sich herausgestellt, daß er die Penetration der Viria von Herpesvirus hominis blockiert. Wird er nach der Penetrationsphase verabreicht, so wird die herpesinduzierte Riesenzellbildung völlig verhindert, ohne daß jedoch die Virus-Ausbeute reduziert ist. Der Zeitpunkt der Blockade fällt mit keiner anderen identifizierbaren Phase der Virus-synthese zusammen (3). Die DNS-, RNS- und Proteinsynthese ist nicht gestört. Dagegen hat sich gezeigt, daß der Einbau von Cholin und von Äthanolamin in Lecithin bzw. Colamin-Cephalin reduziert ist (4). Schließlich hat sich ergeben, daß diese Substanz die Cholin-Kinase hemmt. Die bisherigen Versuche gestatten die Schlußfolgerung, daß die Hemmung des Einbaus von Cholin auf eben diesem Effekt, auf einer Hemmung der Aktivität dieser Kinase beruht. Ein zusätzlicher Effekt auf den Transport von Cholin durch die Zellmembran hindurch, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Und schließlich hat sich gezeigt, daß dem Dimer des Grundbausteins von Cpd 48/80 Wirkungen fehlen, die die Gesamtsubstanz besitzt. Das Dimer hemmt nämlich lediglich die Aktivität der Cholin-Kinase bzw. den Gesamteinbau von Cholin oder von Äthanolamin.

Es erschien deshalb wünschenswert, sich eingehender mit der Wechselwirkung zwischen Cpd 48/80 und der Zelle zu befassen, einer Wechselwirkung, die vorläufigen Versuchen zufolge in einer festen und dauerhaften Bindung besteht (7).

Die hier dargelegten Versuche haben gezeigt, daß ein radioaktiv markiertes Präparat von Cpd 48/80 aus dem Kultur-Über-

stand verschwindet und sich "in" den Zellen anreichert. Dort bleibt es irreversibel gebunden, d.h. läßt sich nicht mehr auswaschen. Dabei ist unklar, an welchen Zellbestandteil es sich bindet. Auch entsteht die Frage, ob es überhaupt in die Zelle eindringt oder nicht vielmehr ausschließlich auf der Zellmembran gebunden bleibt.

Die Beobachtung, daß Cpd 48/80 die Lysosomen aktiviert (6), spricht nicht gegen die Möglichkeit einer ausschließlichen Bindung an die Zellmembran. Vielmehr ist es denkbar, daß Cpd 48/80 durch Pinozytose "in" die Zellen gelangt und vom Lumen der Lysosomen aus eine Schädigung der Lysosomenmembran herbeiführt, die sich als "Aktivierung der Lysosomen" nachweisen läßt. Autoradiographische Versuche und Zellfraktionierungsexperimente haben bisher keine eindeutige Antwort über den Bindungsort von 48/80 möglich gemacht (4).

Interessanterweise bleibt die gesamte Radioaktivität von Cpd 48/80 in den Zellen fixiert - auch bei 24stündiger Inkubation. wir können jedoch bei Versuchen über den Cholin-Einbau feststellen, daß der Hemmeffekt im Verlaufe einiger Stunden verschwindet. worauf dieser Effekt beruht, läßt sich vorläufig noch nicht angeben.

Bereits ganz zu Beginn unserer Versuche ließ sich feststellen, daß ^3H -markiertes 48/80 (mittels Lipoidextraktion aus den Zellen gewonnen) andere Eigenschaften aufweist - es hat einen höheren RF-wert - als eine Probe dieser Substanz, die nicht mit den Zellen in Berührung gekommen war.

Es muß angenommen werden, daß die veränderten Eigenschaften durch strukturelle Änderungen des Moleküls zustande gekommen sind. Es ist denkbar, daß Cpd 48/80 in der Zelle metabolisiert wird. Jedoch könnte auch eine Bindung an den einen

oder anderen Lipoidbaustein entstanden sein. Schließlich könnte auch eine Verbindung mit gewissen Ionen des Zellmilieus eingetreten sein und den erhöhten RF-Wert verursachen - eine Möglichkeit, die die geringste Wahrscheinlichkeit zu haben schien.

Eine Bindung an die Lipoide (wie Kephalin, Lecithin, Sphingomyelin oder Lysolecithin) ließ sich durch unsere Versuche sicher ausschließen. Auch nach der Soaltung mit Phospholipasen war der RF-Wert des aus den Zellen extrahierten ^3H -48/80 unverändert. Aus diesen Versuchen geht außerdem hervor, daß 48/80 kein Inhibitor für die Phospholipasen A, C und B ist.

Die Experimente haben schließlich deutlich gezeigt, daß Cl-Ionen in der Lage sind, den RF-Wert von ^3H -48/80 zu verändern. Diese Chlorid-Ionen stammen aus den Zellen. Durch Versuche mit der Dünnschicht-Technik ließ sich zeigen, daß in wässriger Phase NaCl auf Cpd 48/80 einwirkt: es resultiert ein RF-Wert wie er in den Lipoidextrakten aus der Zelle gefunden wurde.

Eine Bindung der Cl-Ionen an die Imino-Gruppe des Moleküls bleibt deshalb als wahrscheinliche Ursache des geänderten RF-wertes zurück. In einem gleichartigen System konnten wir keine Hinweise erhalten, daß sich Cpd 48/80 an PO_4 -Reste bindet. Dies läßt sich jedoch durch diese Versuche in der dünnen Schicht nicht ausschließen. Eben diese Annahme, nämlich eine Bindung an Phosphat-Reste, wurde aber durch andere Versuche gestützt. Cpd 48/80 geht nämlich mit hoch gereinigter DNS im Tris-Milieu eine Bindung ein, wobei ein Präzipitat entsteht. Das Dimer ist hierzu nicht in der Lage, obwohl es ebensolche Imino-Gruppen besitzt. Da es sich um eine salzartige Bindung handelt, möchten wir folgern, daß die Imino-Gruppen mit den stark sauren Valenzen der DNS, also den Phos-

phatresten, reagieren. Es ist wichtig, daß diese Bindung von den relativen Konzentrationen von 48/80 und der DNS abhängt.

Cpd 48/80 ist ein Gemisch aus Mono-, Di-, Tri- und vielleicht Tetrameren (13). Da das Dimer bei Anwesenheit von DNS nicht bindungsaktiv ist, folgern wir, daß der Abstand zwischen seinen beiden Imino-Gruppen zu gering ist, um die Phosphatgruppen der DNS zu verbinden. Nur das Tri- oder Tetramer würde dazu in der Lage sein. Leider ist es bisher nicht möglich gewesen, das Trimer in reiner Form zu gewinnen.

V. Zusammenfassung

Das Cpd 48/80 wird fest von Kaninchennierenzellen gebunden. Bei Lipoidextraktionen dieser Zellen geht das Cpd 48/80 in Abhängigkeit der Menge des zur Extraktion verwendeten Chloroform-Methanol-Gemisches fast vollständig in den Extrakt über. Die Dünnschichtchromatographie dieses Extraktes ergibt eine deutliche Veränderung des RF-wertes von Cpd 48/80 gegenüber der in Methanol oder Wasser gelösten Kontrollsubstanz. Ein Einfluß der Lipide oder Proteine des Extraktes auf den RF-wert konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Auch wenn das Cpd 48/80 erst zu einem Lipoidextrakt aus Kaninchennierenzellen zugegeben wird, ändert sich der RF-wert der Mischung in der charakteristischen Weise. Diese Änderung ist unabhängig von Temperatur und Zeit. Durch weitere Versuche ließ sich zeigen, daß diese Änderung in spezifischer Weise durch die Chlorid-Ionen der Zelle hervorgerufen wird. Es wäre hierbei eine Bindung der Cl-Ionen an Cpd 48/80 denkbar. Das Cpd 48/80 bindet sich wahrscheinlich auch an die Phosphatreste der DNS. Eine nur uncharakteristische Änderung der Laufeigenschaften des Cpd 48/80 ließ sich auch durch Veränderung des pH-wertes im Laufsystem erreichen.

VI. Literaturverzeichnis

1. FALKE, D. (1967). Ca^{++} , Histidin und Zn^{++} als Faktoren bei der Riesenzellbildung durch das Herpesvirus hominis.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 153, 175-189.
2. FALKE, D. (1967). Syncytienbildung bei Herpesvirus hominis.
Zentralblatt für Bakteriologie I Orig. 205, 160-164.
3. FALKE, D. (1970). wechselseitige Dissoziierbarkeit von DNS-Synthese und Riesenzellbildung bei Herpesvirus hominis durch Cytosin-Arabinosid und durch Compound 48/80.
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Orig. 212, 390-394.
4. FALKE, D.: unveröff.
5. FALKE, D., BITTER-SULZMANN, D. u. CLAUS, I. (1969). Riesenzellbildung und virusspezifische Antigene bei Herpesvirus hominis: Informationsfluß der Eltern-DNS.
Archiv für die gesamte Virusforschung 27, 317-341.
6. FALKE, D. u. KAHL, G.F. (1970). Die Hemmung der Riesenzellbildung durch Compound 48/80 nach der Infektion mit dem Herpesvirus hominis. II. Die Aktivierung der Lysosomen.
Archiv für die gesamte Virusforschung 30, 353-366.

7. FALKE, D. u. NETTER, K.J. (1969). Die Hemmung der Riesenzellbildung durch das sogenannte Compound 48/80 nach der Infektion mit dem Herpesvirus hominis. I. Die Wirkung auf die Virussynthese.
Archiv für die gesamte Virusforschung 28, 308-324.
8. FALKE, D. u. PETERKNECHT, W. (1968). DNS-, RNS- und Proteinsynthese und ihre Relation zur Riesenzellbildung in vitro nach Infektion mit Herpesvirus hominis.
Archiv für die gesamte Virusforschung 24, 267-287.
9. FALKE, D., SCHLEFER, H.G. u. BIERTEL, W. (1967). Lipoid-Analysen bei Riesenzellbildung durch Herpesvirus hominis.
Zeitschrift für Naturforschung, Band 22 b, Heft 12, 1360-1362.
10. GABBAY, E. u. GLASER, R. (1970). Topography of nucleic acid helices in solutions. Comparative studies of the interactions of aliphatic diammonium salts with double- and triple stranded deoxyribo homopolymers, hybrid homopolymers and ribohomopolymers.
Biochem.Biophys.Acta, 224, 272-275.
11. KUSCHINSKY, G. u. LÜLLMANN, H. (1967). Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
12. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. u. RANDALL, R.J. (1951).
Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent.
J.Biol. Chem. Vol. 193, 265-275.

13. PATON, W.D.M. (1951). Compound 48/80: a potent histamine liberator.
British Journal of Pharmacology 6, 499.
14. STAHL, E. (1967). Dünnschichtchromatographie (Ein Laboratoriumshandbuch).
1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
15. STAHL, E. (1967). Dünnschichtchromatographie (Ein Laboratoriumshandbuch).
2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

TABELLEN und ABLEITUNGEN

Tabelle I

Riesenzellbildung 24 Std. p.i. nach Zugabe von ^3H -48/80
oder 48/80 zu Kaninchennierenzellen in vitro.

	^3H -48/80	48/80
1 μg	4+ ¹⁾	4+
5 μg	2+	2+
10 μg	-	-
25 μg	-	-
50 μg	-	-
75 μg	-	-
Viruskontrolle	4+	4+

1)

Ausmaß der Riesenzellbildung von + bis 4+ geschätzt.

Tabelle II

Bindung von ^3H -48/80 durch Kulturzellen

Versuch	24 Std. 3.1.		48 Std. 3.1.	
	ZPE	CPM	ZPE	CPM
Virus + ^3H -48/80 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (2-8 Std.)	ZA	45311		
Viruskontrolle	RZ 4+			
8 Std. ^3H -48/80 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dann 3mal waschen			RZ + und	51781
Virus 24-32 Std.			ZA +	
RZ = Riesenzellen	ZPE =	zytotoxischer Effekt		
ZA = Zellabkuglung	CPM =	Impulse pro Minute		

Tabelle III

Aufnahme von ^3H -48/80 aus dem Kulturmedium durch Zellen

Zeit nach Zugabe	CPM im Kulturüberstand
vor Zugabe	2212
10 Min.	1565
24 Std.	680
48 Std.	625
72 Std.	504
10 μg ^3H -48/80 pro Petrischale zugegeben	

Tabelle IV

Aufnahme von ^3H -48/80 durch Kaninchennierenzellen

Inkubationsdauer	CPM/mg Protein
10 Min.	2500
30 Min.	3400
60 Min.	6900
120 Min.	7500

10 μg ^3H -48/80 pro Petrischale

Je 3 Petrischalen pro Gruppe

Tabelle V

Lauer des Cpd 48/80-Effektes auf den ³H-Cholin-Einbau in

Zellen

Behandlung	³ H-Cholin	CPM (mg Protein)
Kontrolle		
0 - 8 Stunden	7 - 8 Std.	61.000
Cpd 48/80 (25µg/ml)		
0 - 8 Stunden	7 - 8 Std.	15.100
Kontrolle		
0 - 8 Stunden	11 - 12 Std.	63.500
3x waschen		
Cpd 48/80 (25µg/ml)		
0 - 8 Stunden	11 - 12 Std.	31.200
3x waschen		
Kontrolle		
0 - 8 Stunden	24 - 25 Std.	52.000
3x waschen		
Cpd 48/80 (25µg/ml)		
0 - 8 Stunden	24 - 25 Std.	50.000
3x waschen		

Extrakt M 1950	Extrakt M 1951	Extrakt M 1700	
+	+		Zugabe von Cpd ^3H -48/80 nach der Beschallung
C, ^3H 3 ml 1 mg pro 2 ml Methanol	0,3 ml ^3H -48/80 1 mg/2 ml Methanol		Menge des zugegebenen Cpd ^3H -48/80
7304620 cpm	7304620 cpm		Radioaktivität des zugegebenen Cpd ^3H -48/80
		+	Zugabe des Cpd ^3H -48/80 vor der Beschallung
		100 ug	Menge des Cpd ^3H -48/80 pro Roux-Flasche
		16-17 Stunden	Inkubationszeit des Cpd ^3H -48/80 in den Roux-Fl.
5	5	15	Anzahl der zur Extrakterstellung verwendeten Roux-Flaschen
5 ml	15 ml	150 ml	Menge des zur Filtration verwendeten Chloroform-methanolgemisches (2 : 1)
3 ml Methanol-extrakt	3 ml Methanol-extrakt	6 ml Methanol-extrakt u. 3 ml Athanolextrakt	Menge des fertigen Extraktes
666 126 cpm	318 773 cpm	119 197 cpm	Radioaktivität im Filter
3 425 720 cpm	4 690 370 cpm	7 572 695 cpm	Radioaktivität im fertigen Extrakt Beim Extrakt M 1700 wurden 50 ml des Chloroform-methanolextraktes nach dem Eindampfen in Athanol aufgenommen. Hier ist die Summe der Radioaktivität des Methanol- und Athanolextraktes angegeben.
19,4 %	6,1 %	1,7 %	Prozentanteil der Radioaktivität des fertigen Extraktes im Filter-Rückstand.
56,0 %	68,5 %		Prozentanteil des Verlustes der eingebrachten Menge durch Adsorption an die zur Extrakterstellung verwendeten Glasgefäße.

+ = Arbeitsgang durchgeführt

Tabelle VII

Zusammensetzung des Spaltgemisches

Äther	Enzym (Crotalus atrox)	H ₂ O	Methanol	Spaltung	Zeitdauer der Enzymeinwirkung
5 ml	0,1 ml	1,3 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	1,1 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,9 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,7 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,6 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,5 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,4 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,3 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,2 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	-	1,05 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,85 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,65 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,45 ml	-	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,3 ml	+	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,4 ml	0,3 ml	+++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,6 ml	0,3 ml	++++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,8 ml	0,3 ml	+++++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	1,0 ml	0,3 ml	+++++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,25 ml	+++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,2 ml	+++++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,15 ml	+++++	6-7 Std.
5 ml	0,1 ml	-	0,1 ml	+++++	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	+++++	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,1 ml	+++++	2 Std.
5 ml	0,1 ml	0,4 ml	0,1 ml	+++++	2 Std.
5 ml	0,1 ml	1,2 ml	0,1 ml	+++++	2 Std.

Grad der Spaltung bei Variationen der Anteile von Wasser und Methanol am Spaltgemisch und bei unterschiedlicher Zeitdauer der Enzymeinwirkung.



Abb.1: Verteilung der Jodflecken eines Lipoidextraktes aus Kaninchennierenzellen(d) und der Referenzsubstanzen Sphingomyelin(c), Lecithin (b) und Kephalin(a) nach der Chromatographie auf der Dünnschichtplatte.

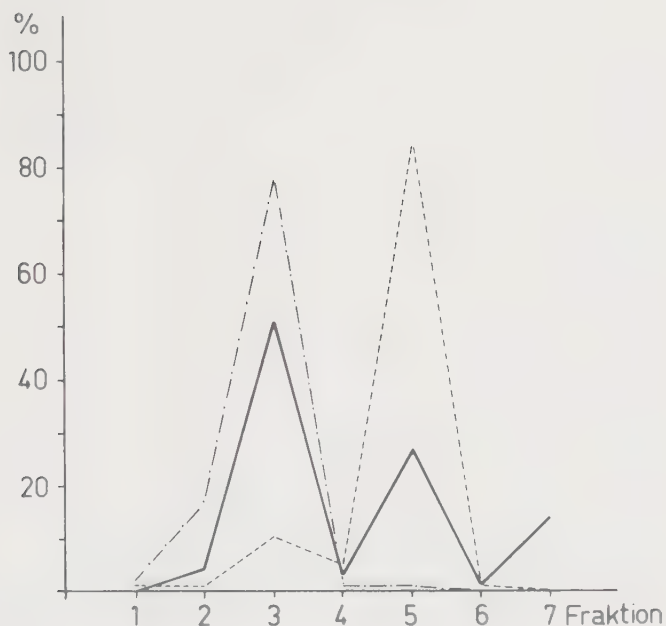


Abb.2 Verteilung der Radioaktivität nach der Auftrennung der mit ^3H Ölsäure (—), ^3H Äthanolamin (---) oder ^3H Cholinchlorid (- - -) markierten Lipoidextrakte auf der Lünnschichtplatte.

Abszisse: fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

In der 2. Fraktion ist das Sphingomyelin, in der 3. Fraktion das Lecithin, in der 5. Fraktion das Kephalin und in der 7. Fraktion die Mono-Li- und Triglyceride enthalten.

Aufgetragene Radioaktivität des mit ^3H Ölsäure markierten Lipoidextraktes 57.819 cpm (= 100%), des mit ^3H Äthanolamin markierten Lipoidextraktes 327.029 cpm und des mit ^3H Cholinchlorid markierten Lipoidextraktes 14.081 cpm.

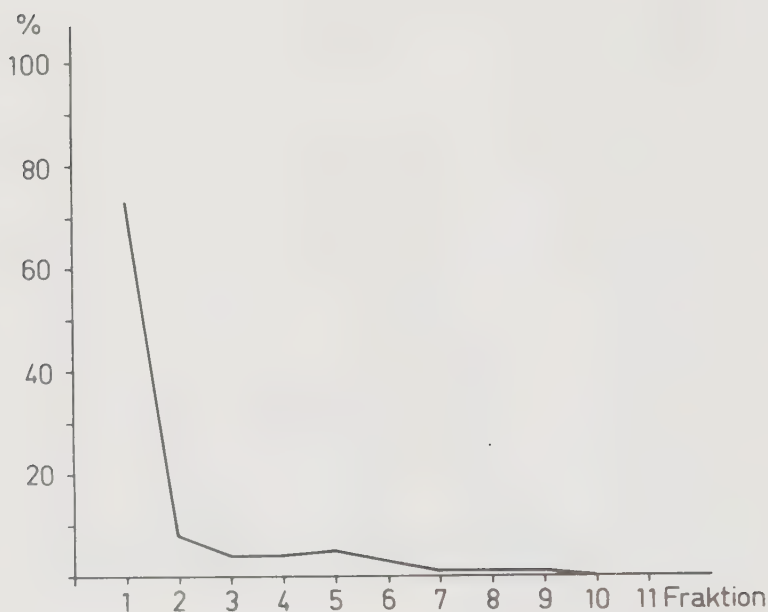


Abb. 2 Verteilung der Radioaktivität des Cpd ^3H 48/80 auf einer Lössschichtplatte nach der Chromatographie in Standardlaufmittelsystem für Lipide.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecke

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der aufgetragenen Radioaktivität

Das Cpd ^3H 48/80 ist im wesentlichen in der 1. Fraktion enthalten.

Aufgetragene Radioaktivität: 15499 cpm.

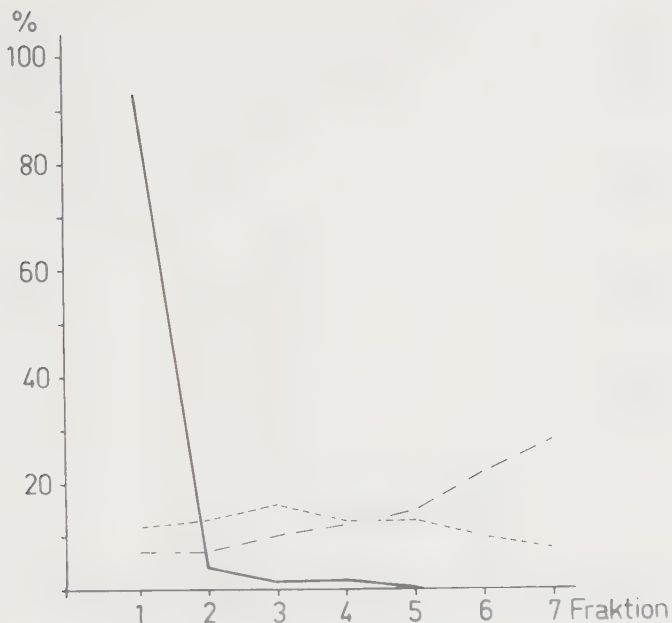


Abb.4 Verteilung der Radioaktivität des Cpd ^3H 48/80 nach der Chromatographie auf Dünnschichtplatten, deren Sorptionssubstanzen bei ihrer Herstellung in Wasser (—), 0,5 (---) und 1 n (-.-) Natronlauge gelöst waren.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der aufgetragenen Radioaktivität

Mit steigender Konzentration der Natronlauge nimmt auch die Verteilung des Cpd ^3H 48/80 in Richtung der Laufmittelfront kontinuierlich zu.

Aufgetragene Radioaktivität des Cpd ^3H 48/80 auf der mit Wasser gegossenen Platte: 310753 cpm, auf der mit 0,5 n Natronlauge gegossenen Platte: 590586 cpm und auf der mit 1 n Natronlauge gegossenen Platte: 553072 cpm.

(Auf der mit 0,5 n Natronlauge gegossenen Platte war die Laufstrecke etwa um 2 Fraktionen länger als auf den beiden anderen Platten).

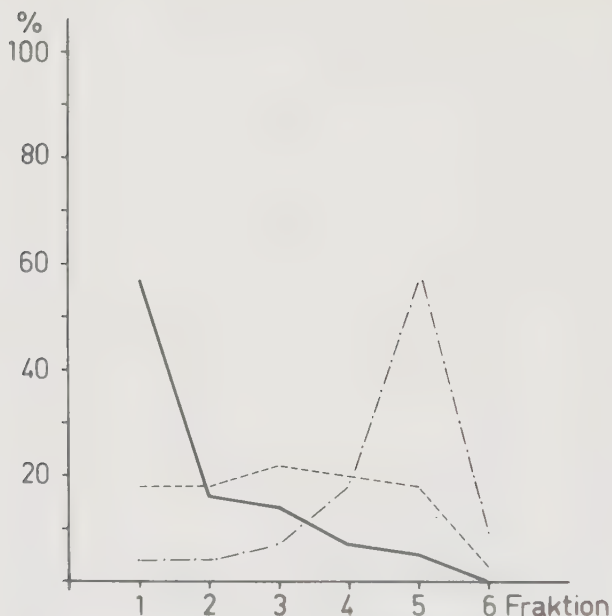


Abb. 5 Verteilung der Radioaktivität des Cpd ^3H -48/80 auf Dünnschichtplatten, die in einem Laufmittelsystem chromatographiert wurden, das anstelle von wasser 2 (—), 5 (---) und 10 (-.-.) Anteile 25%iges Ammoniak enthielt.

wie im Standardsystem waren in den Laufmitteln außerdem 65 Anteil Chloroform und 35 Anteile Methanol enthalten.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der aufgetragenen Radioaktivität

Mit steigender Ammoniakkonzentration nimmt die Verteilung des Cpd ^3H -48/80 auf den Dünnschichtplatten kontinuierlich in Richtung der Laufmittelfront zu.

Radioaktivität auf der Platte, die mit 2 Anteilen Ammoniak chromatographiert wurde: 9947 cpm, auf der Platte die mit 5 Anteilen Ammoniak chromatographiert wurde: 9675 cpm und auf der Platte die mit 10 Anteilen Ammoniak chromatographiert wurde: 9571 cpm.

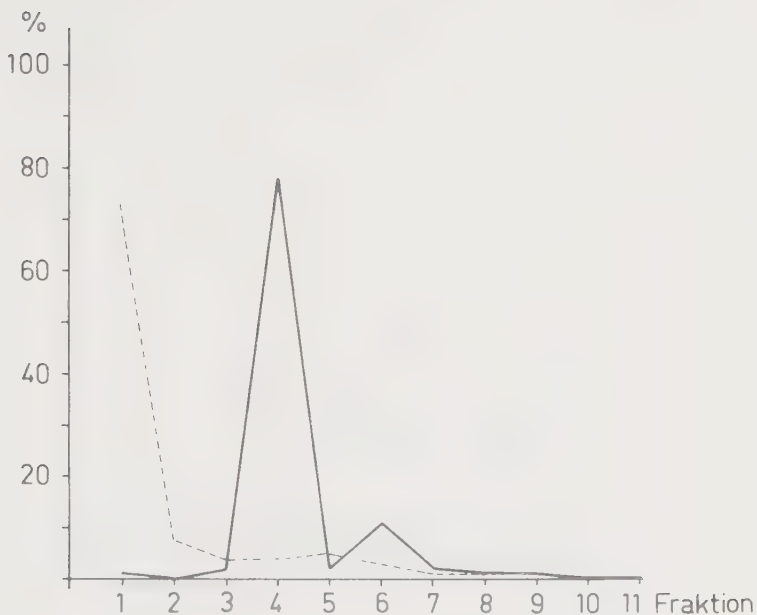


Abb. 6 Verteilung der Radioaktivität nach der Chromatographie eines Lipoidextraktes mit dem Cpd ^3H -48/80 (—) im Standard-system. Der Extrakt wurde aus Zellen hergestellt, die 8 Std. bei 37°C mit dem Cpd ^3H -48/80 inkubiert waren.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecke

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der aufgetragenen Radioaktivität

Das Cpd ^3H 48/80 ist im wesentlichen in der 4. und zu einem kleinen Teil auch in der 6. Fraktion enthalten.

Radioaktivität des aufgetragenen Extraktes: 8054 cpm.

Zur Kontrolle die Verteilungskurve des in Methanol gelösten Cpd ^3H 48/80 (---) (s. Abb. 3).

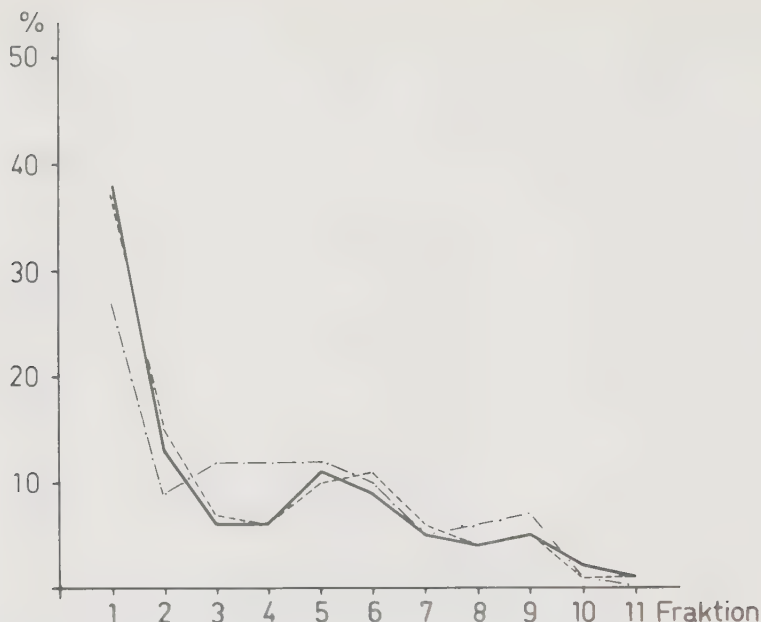


Abb.7 Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte nach der Chromatographie der Konzentrate, von Spaltgemischen eines Lipoidextraktes mit Cpd ^3H -48/80 und den entsprechenden Kontrollen im Standardsystem.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Aufgetragene Radioaktivität des Spaltgemisches (—) 3.888 cpm, der Nullkontrolle (---) 1.480 cpm und des Kontrollgemisches (-.-.), in dem der Lipoidextrakt mit Cpd ^3H -48/80 durch in Methanol gelöstem Cpd ^3H -48/80 ersetzt war, 7.177 cpm.

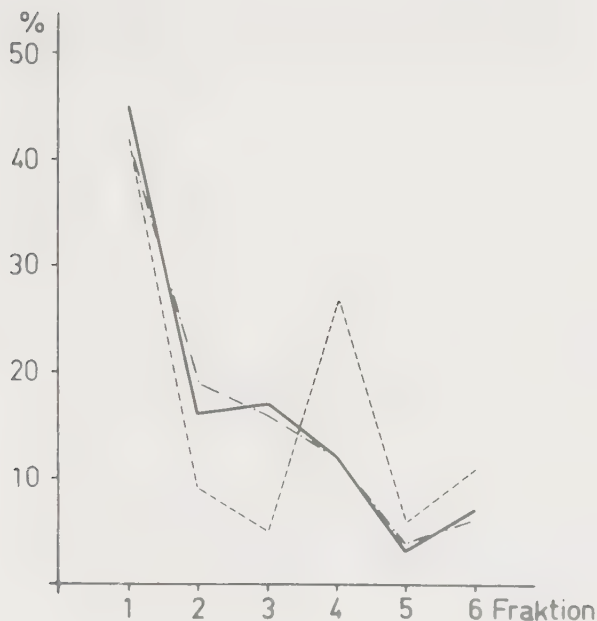


Abb.8 Verteilung der Radioaktivität auf der Lünnschichtplatte nach der Chromatographie der angereicherten Spaltgemische eines Lipoidextraktes mit Cpd ^3H -48/80 (---), eines Gemisches aus Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin mit Cpd ^3H -48/80 (—) und eines Kontrollgemisches (-.-), das anstelle des Lipoidextraktes mit Cpd ^3H -48/80 bzw. des Lipoidgemisches mit Cpd ^3H 48/80 in Methanol gelöstes Cpd ^3H 48/80 enthielt.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Die Spaltgemische enthielten vor der Konzentrierung 5 ml Äther, 0,2 ml in wasser gelöstes Enzym, 0,15 ml Methanol und 0,15 ml Lipoidextrakt mit Cpd ^3H -48/80, Lipoidgemisch mit Cpd ^3H -48/80 oder nur Cpd ^3H -48/80.

(siehe nächste Seite)

Auf die Dünnschichtplatte aufgetragene Radioaktivität des
konzentrierten Spaltgemisches mit dem Lipoidextrakt 14.367 cpm,
des konzentrierten Spaltgemisches mit der Lipoidmischung
16.589 cpm und des konzentrierten Kontrollgemisches 26.365 cpm.

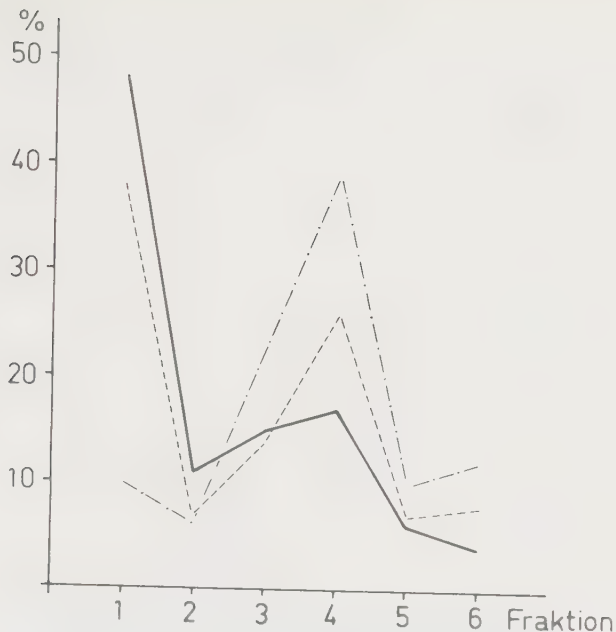


Abb.9 Verteilung der Radioaktivität auf der Lünnschichtplatte nach der Chromatographie von konzentrierten Spaltgemischen mit einem Anteil von 0,3 (—), 0,25 (---) und 0,2 ml (-.-) Methanol in dem die Lipide und das Cpd ^3H 48/80 gelöst waren. Alle 3 Spaltgemische enthielten außer diesem Anteil vor der Konzentrierung 5ml Äther und 0,2 ml Wasser, in dem das Enzym gelöst war.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Aufgetragene Radioaktivität des konzentrierten Spaltgemisches mit 0,3 ml Methanol 8.626 cpm, mit 0,25 ml Methanol 10.149 cpm und mit 0,2 ml Methanol 4.372 cpm.

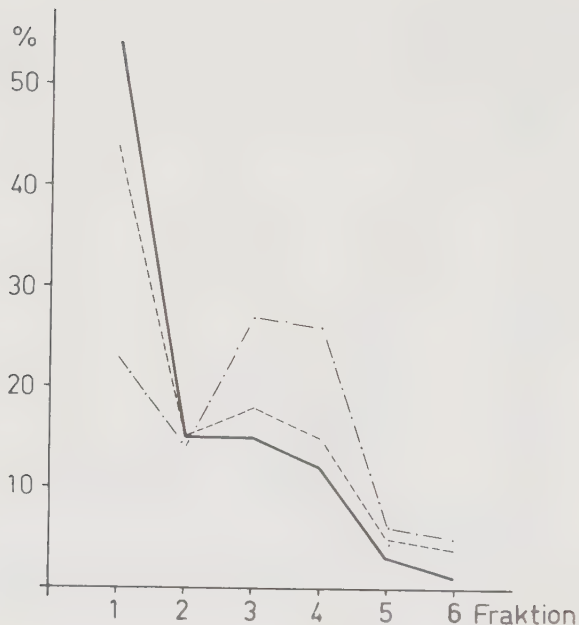


Abb.10 Verteilung der Radioaktivität auf der Lünnschichtplatte nach der Chromatographie von konzentrierten Spaltgemischen mit einem Anteil von 0,2 (—), 0,4 (--) und 0,8 (-.-) ml wasser in dem das Enzym gelöst war.

Alle 3 Spaltgemische enthielten außerdem vor der Konzentrierung 5 ml Äther und 0,3 ml Methanol, in dem die lipide und das Cpd ^3H 48/80 gelöst waren.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Aufgetragene Radioaktivität des konzentrierten Spaltgemisches mit 0,2 ml Wasser 7.461 cpm, mit 0,4 ml wasser 5.164 cpm und mit 0,8 ml wasser 2.857 cpm.

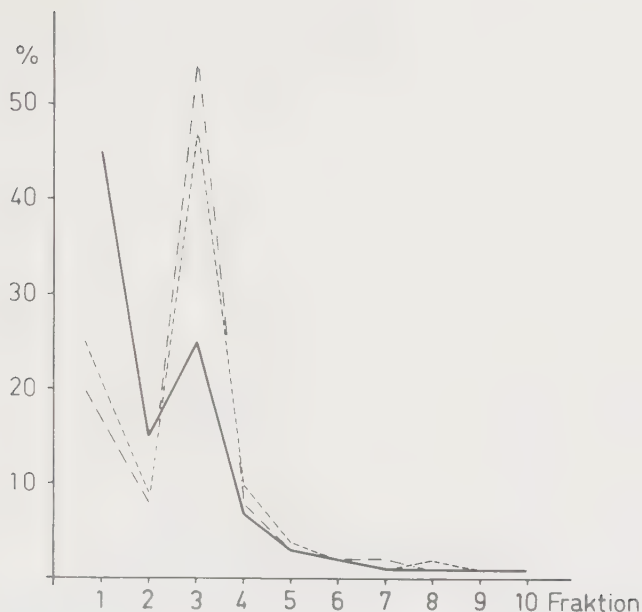


Abb.11 Verteilung der Radioaktivität auf der Lünnschichtplatte nach der Chromatographie von Mischungen des Cpd ^3H 48/80 mit einem Anteil von 20 % (—), 50 % (---) und 80 % (-.-) Puffer.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Aufgetragene Radioaktivität der Mischung mit 20% Puffer 1.707 cpm mit 50% Puffer 1.449 cpm und mit 80% Puffer 1.677 cpm.

(Die 3. und 4. Fraktion der ursprünglich 11 Fraktionen wurde zu einer Fraktion vereinigt, da das Maximum in diesem Bereich durch die Fraktionierung auf beide Fraktionen verteilt wurde.)

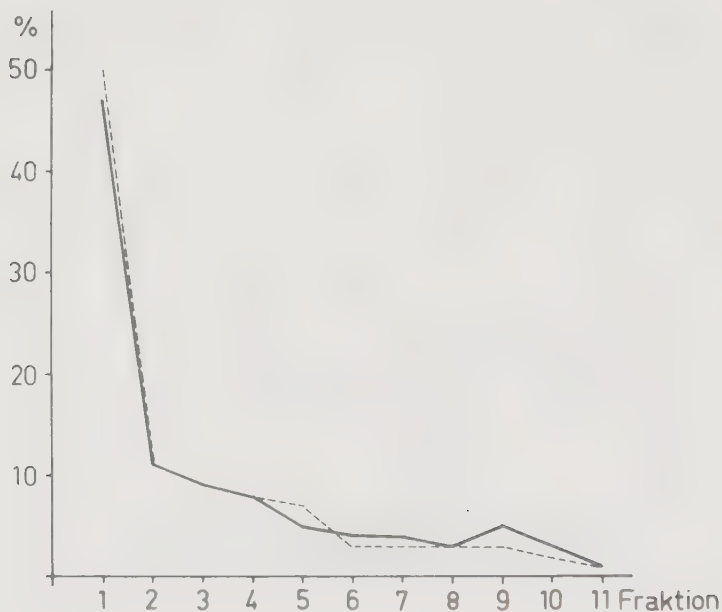


Abb.12 Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte nach der Chromatographie von Mischungen des Cpd ^3H 48/80 mit einem Anteil von 20% (—), und 80% (---) Phosphatsalzlösung. (Die Kurve mit einem Anteil von 50% Phosphatsalzlösung ist wegen fast gleichen Verlaufes nicht gezeichnet.)

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

aufgetragene Radioaktivität der Mischung mit 20% Phosphatsalzlösung 1.063 cpm, mit 50% Phosphatsalzlösung 1.200 cpm und mit 80% Phosphatsalzlösung 1.100 cpm.

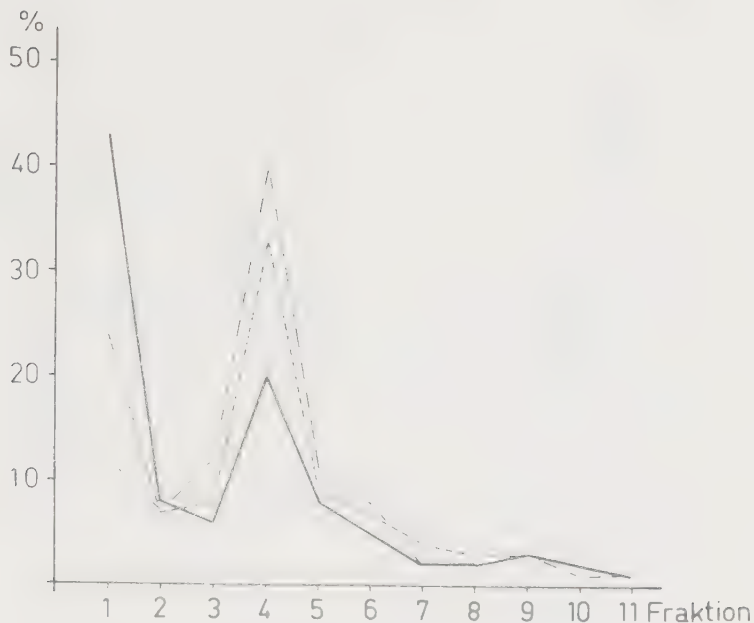


Abb. 13 Verteilung der Radioaktivität auf der Lössschichtplatte nach der Chromatographie von Mischungen des Cob ^{60}Co 48/80 mit einem Anteil von 20 % (—), 50 % (---) und 80 % (-.-) Kochsalzlösung.

Abszisse: Fraktionen entlang der Laufstrecken

Ordinate: Prozentanteile der Fraktionen an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität

Aufgetragene Radioaktivität der Mischung mit 20 % Kochsalzlösung 778 cpm, mit 50 % Kochsalzlösung 1.215 cpm und mit 80 % Kochsalzlösung 979 cpm.

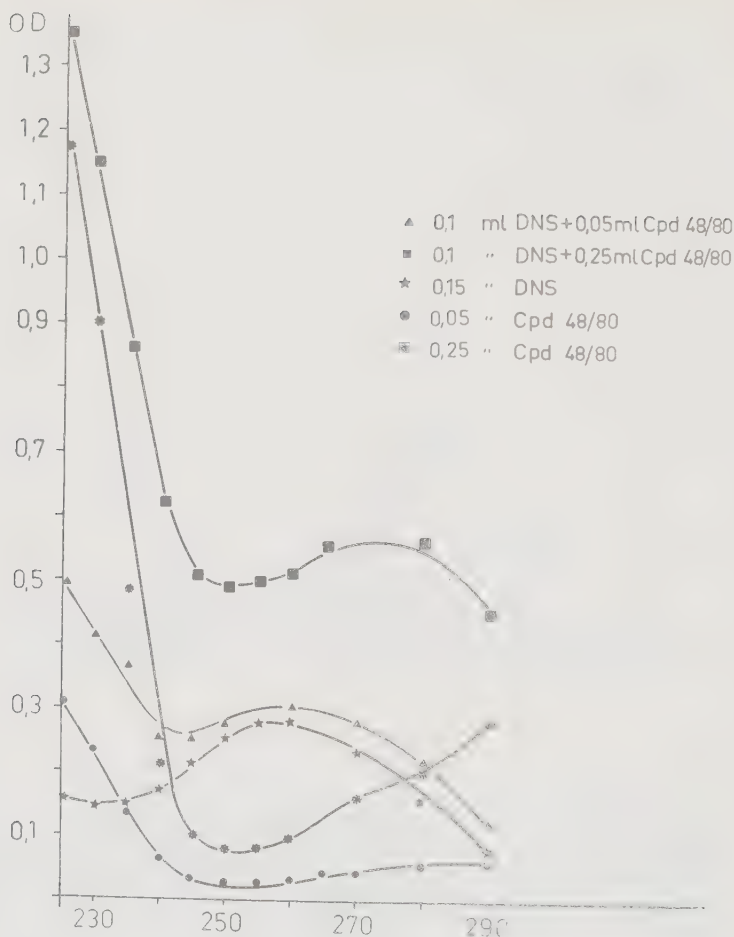


Abb.:14: Die DNS wurde zu 1 mg in 1,0 ml 0,01 m Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst. Cpd 48/80 wurde zu 1 mg im gleichen Puffer zu 1 ml gelöst. Im Versuchsansatz haben wir 9,9 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) mit 0,05 oder 0,25 ml Cpd 48/80 gemischt, 0,1 ml DNS zugegeben und erneut gemischt. Nach 20 Minuten Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde die optische Dichte im Zeiß-Spektralphotometer gegen den Blancwert (Puffer) gemessen.

Ich möchte Herrn Professor Falke für seine Hilfe bei der Durchführung der Versuche und für sorgfältige Korrekturen herzlich danken. Mein Dank gilt auch Herrn Professor Klein für die guten Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

L e b e n s l a u f

Am 6.3.1947 wurde ich in Heiligenstadt/Bichsfeld geboren.
Ich bin Mitglied der römisch-katholischen Kirche.
In Heiligenstadt besuchte ich acht Jahre die Grundschule.
Im Sommer 1961 verließ ich mit meinen Eltern und meinen drei
Geschwistern die DDR. Am Aufbaugymnasium in Bensheim
bestand ich im Frühjahr 1966 das Abitur. Anschließend
begann ich in Mainz mit dem Medizinstudium. Im April 1967
legte ich die naturwissenschaftliche und im Oktober 1968
die Ärztliche Vorprüfung ab. Zur Zeit absolviere ich an
der Mainzer Johannes-Gutenberg-Universität das medizinische
Staatsexamen, das bis zum 30. Juni 1972 andauern wird.

